

**Entwicklung und Anwendung moderner Testverfahren zur
Auffindung und Optimierung der Antitumorwirkung neuartiger
Diphenylethylendiaminplatin(II)-Komplexe**

**Habilitationsschrift zur Erlangung des
akademischen Grades "Dr. rer. nat. habil."
für das Fach Pharmazeutische Chemie**

**an der
Naturwissenschaftlichen Fakultät IV
-Chemie und Pharmazie-
der
Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Günther Bernhardt
aus
Schierling
1993**

Liste der in der Habilitationsschrift zusammengefaßten Veröffentlichungen*:

1. Kämmerer A, Bernhardt G (1989) Experimentelle Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Metaboliten aus *Paxillus atrotomentosus* (Batsch: Fr.)
Z Mykol 55: 175-188 **S. 86**

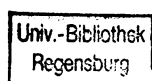
2. Müller R, Gust R, Jennerwein M, Reile H, Laske R, Krischke W, Bernhardt G, Spruß T, Engel J, Schönenberger H (1989) Tumor inhibiting [1,2-bis(fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes. Part I: Synthesis.
Eur J Med Chem 24: 341-348 **S. 101**

3. Reile H, Birnböck H, Bernhardt G, Spruß T, Schönenberger H (1990) Computerized determination of growth kinetic curves and doubling times from cells in microculture.
Anal Biochem 187: 262-267 **S. 109**

4. Müller R, Gust R, Bernhardt G, Keller C, Schönenberger H, Seeber S, Osieka R, Eastman A, Jennerwein M (1990) [D,L-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II) a new compound for the therapy of ovarian cancer.
J Cancer Res Clin Oncol 116: 237-244..... **S. 115**

5. Reile H, Müller R, Gust R, Laske R, Krischke W, Bernhardt G, Spruß T, Jennerwein M, Engel J, Seeber S, Osieka R, Schönenberger H (1990) Tumor inhibiting [1,2-bis(fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes Part II: Biological evaluation in-vitro studies on the P-388-D₁ leukemia cell line.
Arch Pharm (Weinheim) 323: 133-140..... **S. 123**

6. Reile H, Spruß T, Müller R, Gust R, Bernhardt G, Schönenberger H, Engel J (1990) Tumor inhibiting [1,2-bis(fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes, III: Evaluation of the mammary tumor inhibiting properties.
Arch Pharm (Weinheim) 323: 301-306..... **S. 131**



1150522/10

*Die aufgeführten Arbeiten sind im Text durch **Fettdruck** gekennzeichnet.

7. vom Orde H-D, Reile H, Müller R, Gust R, Bernhardt G, Spruß T, Schönenberger H, Burgemeister T, Mannschreck A (1990) Tumor-inhibiting [1,2-bis(fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes V. Synthesis and evaluation of enantiomeric [1,2-bis(4-fluorophenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II) complexes.
J Cancer Res Clin Oncol 116: 434-438..... S. 137
- ✓ 8. Reile H, Spruß T, Bernhardt G, Müller R, Gust R, Schönenberger H (1991) Tumour inhibiting [1,2-bis(4-fluorophenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II) complexes: IV Biological evaluation - in vivo studies on the P388 leukemia.
Arch Pharm (Weinheim) 324: 405-409..... S. 142
9. Bernhardt G, Spruß T, Schönenberger H (1991) Einsatz menschlicher Tumorzellkulturen als Testmodelle bei der Entwicklung von Wirkstoffen für die Krebstherapie.
Forum für Interdisziplinäre Forschung (Zeitschrift der STEIG e.V.) 4: 24-28 .. S. 147
- ✓ 10. Altman J, Castrillo T, Beck W, Bernhardt G, Schönenberger H (1991) Metal complexes with biologically important ligands 62. Platinum(II) complexes of 3-(2-aminoethoxy)estrone and -estradiol. Inorg Chem 30: 4085-4088 S. 152
- ✓ 11. Koch M, Bernhardt G (1991) Differential accumulation of stereoisomeric [1,2-bis-(fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes by human breast cancer cells in vitro. J Cancer Res Clin Oncol 117(Suppl): 104 S. 156
12. Reile H, Bernhardt G (1991) Effect of BSO on in-vitro chemosensitivity of human breast and ovarian cancer cell lines against [1,2-bis(fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes. J Cancer Res Clin Oncol 117(Suppl): 105..... S. 157
- ✓ 13. Spruß T, Bernhardt G, Schickaneder E, Schönenberger H (1991) Different response of murine and human mammary tumour models to a series of diastereoisomeric [1,2-bis-(difluorophenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II) complexes.
J Cancer Res Clin Oncol 117: 435-443..... S. 158
14. Schönenberger H, Bernhardt G, Gust R, Müller, R, Spruß T, vom Orde H-D, Keller Ch (1991) Entwicklung von Platinkomplexen zur Behandlung des Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinoms. In: Lang N, Jäger W (eds) Zytostatika-Resistenz, Universitätsverlag Jena, Jena, pp 74-81..... S. 167

15. Bernhardt G, Reile H, Birnböck H, Spruß T, Schönenberger H (1992) Standardized kinetic microassay to quantitate differential chemosensitivity based on proliferative activity. J Cancer Res Clin Oncol 118: 35-43..... S. 175
- ✓ 16. Bernhardt G, Reile H, Spruß T, Koch M, Gust R, Schönenberger H, Hollstein M, Lux F, Engel J (1991) D-17446 (+/-)-(D,L)-[1,2-Bis(4-fluorophenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II). Drugs of the Future 16: 899-903..... S. 184
17. Bernhardt G, Müller R, Gust R, Reile H, Keller C, Spruß T, Schönenberger H (1992) Dichloro[1-(hydroxyphenyl)-2-phenylethylenediamine]platinum(II) complexes. Testing on the human ovarian cancer cell lines NIH-OVCAR-3 and SK-OV-3. Arch Pharm (Weinheim) 325: 93-99..... S. 190
18. Bernhardt G, Gust R, Reile H, vom Orde H-D, Müller R, Keller C, Spruß T, Schönenberger H, Burgemeister T, Mannschreck A, Range K-J, Klement U (1992) [1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II), a new compound for the therapy of ovarian cancer. Part II: Synthesis and preliminary testing of the enantiomeric complexes. J Cancer Res Clin Oncol 118: 201-208..... S. 197
19. Bernhardt G, Gust R, Reile H, vom Orde H-D, Müller R, Keller C, Spruß T, Schönenberger H, Burgemeister T, Mannschreck A, Range K-J, Klement U (1992) [1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II), a new compound for the therapy of ovarian cancer. Part III: Detailed evaluation of the antitumour activity of the enantiomeric complexes on the human NIH-OVCAR-3 ovarian cancer cell line. J Cancer Res Clin Oncol 118: 209-215..... S. 205
- ✓ 20. Reile H, Bernhardt G, Koch M, Schönenberger H, Hollstein M, Lux F (1992) Chemosensitivity of human MCF-7 breast cancer cells to diastereoisomeric diaqua[1,2-diphenylethylenediamine]platinum(II)sulfates and specific platinum accumulation. Cancer Chemother Pharmacol 30: 113-122..... S. 212
21. Beckenlehner K, Bannke S, Spruß T, Bernhardt G, Schönenberger H, Schiess W (1992) Hyaluronidase enhances the activity of Adriamycin in breast cancer models in vitro and in vivo. J Cancer Res Clin Oncol 118: 591-596..... S. 222

22. Bernhardt G, Spruß T, Rustler M (1992) Comparison of MCF-7 and ZR-75-1 cell lines as models for studying hormone dependent human breast cancer in nude mice. In: Fiebig HH, Berger DP (eds) Immunodeficient Mice in Oncology. Contrib Oncol Basel, Karger, vol 42, pp 128-130..... S. 228

23. Spruß T, Bernhardt G, Rustler M (1992) Characterization of ovarian carcinomas NIH-OVCAR-3 and SK-OV-3 growing in the ovary of nude mice. In: Fiebig HH, Berger DP (eds) Immunodeficient Mice in Oncology. Contrib Oncol Basel, Karger, vol 42, pp 135-137..... S. 231

24. Spruß T, Bernhardt G, Schlemmer R, Schönenberger H (1992) Differing responses of hormone-dependent rodent tumors grown in immunodeficient and immunocompetent hosts to hormone-like therapy. In: Fiebig HH, Berger DP (eds) Immunodeficient Mice in Oncology. Contrib Oncol Basel, Karger, vol 42, pp 397-407..... S. 234

25. Schertl S, Lu Z, Bauer KH, Spruß T, Bernhardt G, Schönenberger H (1992) Ein parenteral applizierbares Hydrosol für den schwerlöslichen Platin(II)-Komplex D 17446. APV Symposium, Regensburg, April 1992 S. 245

26. Spruß T, Bernhardt G, Schönenberger H, Engel J (1993) Antitumouractivity of miltefosine alone and after combination with platinum complexes on MXT mouse mammary carcinoma models. J Cancer Res Clin Oncol 119:142-149..... S. 246

27. Kritzenberger J, Bernhardt G, Gust R, Pistor P, Schönenberger H, Yersin H (1993) Dichlorobis(cycloalkylamine)platinum(II) complexes - structure activity relationship on the human MDA-MB-231 breast cancer cell line. Monatshefte für Chemie (im Druck)..... S. 254

Entwicklung und Anwendung moderner Testverfahren zur Auffindung und Optimierung der Antitumorwirkung neuartiger Diphenylethylendiaminplatin(II)-Komplexe

- I. Einführung..... 9**
 - 1. Ursprünge der modernen Krebs-Chemotherapie 9
 - 2. Stellenwert der Chemotherapie bei der Behandlung maligner Tumoren10
 - 3. Klinisch verfügbare Medikamente11
- II. Entwicklung von Arzneimitteln für die Krebstherapie.....12**
 - 1. Herkunft der Substanzen.....12
 - 1.1. Screening von Naturprodukten und Chemikalien.....13
 - 1.2. Synthese neuer Verbindungen13
 - 2. Kriterien für die Entwicklung neuer Analoga13
- III. Teststrategien zur Auffindung und Prüfung neuer Wirkstoffe.....14**
 - 1. Grundlagen15
 - 2. Teststrategien.....15
 - 2.1. Substanzorientierte Testung.....15
 - 2.2. Krankheitsorientierte Testung16
 - 3. Notwendigkeit zur Verbesserung der Testmethoden17
- IV. Verwendung menschlicher Tumorzelllinien18**
- V. Das neue in-vitro-/in-vivo-Konzept18**
 - 1. Tumorbank und Standardisierung der Tumormodelle.....19
 - 1.1. Das Seed-Stock-Konzept.....20
 - 1.2. Charakterisierung der Zelllinien20
 - 2. In-vitro-Methoden zur Beurteilung der Wirkung zytotoxischer Substanzen.....21
 - 3. Der Kristallviolett-Test23
 - 3.1. Bestimmung von Wachstumskurven und Verdopplungszeiten.....25
 - 3.2. Kinetischer Chemosensitivitätstest26
 - 3.2.1. Endpunktmessung versus Verfolgen der Wachstumskinetik26
 - 3.2.2. Quantifizierung der Substanzwirkung27
 - 4. In-vitro-Pharmakologie28
 - 5. Tumoren in der thymusaplastischen Maus29

VI. Platinkomplexe als Zytostatika	30
1. Cisplatin und Carboplatin	30
2. Struktur und Reaktivität	31
2.1. Voraussetzungen für die Antitumorwirkung	32
2.1.1. Zusammensetzung und Raumstruktur wirksamer Cisplatin-Analoga	32
2.1.2. Bedeutung der Abgangsgruppe	33
2.1.3. Bedeutung der Konfiguration	33
2.1.4. Bedeutung der Nicht-Abgangsgruppe	34
2.1.5. Bedeutung der Ladung	34
2.1.6. Bedeutung der Oxidationsstufe	35
2.2. Austauschreaktionen mit Nukleophilen	35
2.2.1. Solvolysenprodukte und Reaktionen mit niedermolekularen Liganden	36
2.2.2. Reaktionen mit Biopolymeren	38
2.2.3. Freisetzung von Amin-Liganden	40
3. Wirkmechanismus	41
4. Toxizität	42
5. Cisplatin-Resistenz	43
6. Platinkomplexe der 2. und 3. Generation	45
VII. Neue Diphenylethylenediaminplatin(II)-Komplexe	46
1. [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylenediamin]platin(II)-Komplexe	48
1.1. Rezeptorbindungsaffinität und östrogene Eigenschaften	48
1.2. Antitumorwirkung in vitro	49
1.3. Antitumorwirkung an hormonsensitiven Nagertumoren in vivo	49
1.4. Wirkungen nach peroraler Applikation	49
1.5. Antitumorwirkung an menschlichen Brustkrebsmodellen in der Nacktmaus	49
1.6. Vorstellungen zum Wirkmechanismus	50
2. [1,2-Bis(2-hydroxyphenyl)ethylenediamin]- und [(Hydroxyphenyl)-2-phenylethylenediamin]-dichloroplatin(II)-Komplexe	50
2.1. In-vitro-Chemosensitivitätstests an menschlichen Ovarialkarzinom-Zelllinien	51
2.1.1. Langzeitexposition von SK-OV-3- und NIH-OVCAR-3-Zellen	51
2.1.2. Stabilität der Komplexe im Kulturmedium	51
2.1.3. Bestimmung der effektiven Einwirkzeit an NIH-OVCAR-3-Zellen	52
2.2. Wirkung von (-)-[1,2-Bis(2-hydroxyphenyl)ethylenediamin]dichloroplatin(II) am NIH-OVCAR-3-Tumor in der Nacktmaus	52

3.	[1,2-Bis(fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Verbindungen	52
3.1.	Wirkung am Ovarialkarzinom	53
3.2.	Struktur-Wirkungs-Beziehungen an menschlichen Mammakarzinomzelllinien	53
3.3.	[1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe	54
3.3.1.	Inaktivierung im Kulturmedium	54
3.3.2.	Ermittlung der effektiven Einwirkzeit an der menschlichen MCF-7-Brustkrebszelllinie.....	54
3.4.	Antitumorwirkung im Nacktmausmodell	55
4.	Plasmaspiegel nach einmaliger i. p. Applikation	55
5.	Entwicklung einer wasserlöslichen Arzneiform.....	56
6.	Bindung an Serumalbumin	56
7.	Aufnahme durch Tumorzellen	58
7.1.	Beziehungen zwischen Struktur, Anreicherung und Antitumorwirkung	59
7.2.	Versuche zur Charakterisierung des Transportsystems	60
8.	Platinierung von DNA in MCF-7-Zellen	61
9.	Toxizität und Mutagenität	62
10.	Kombination mit anderen Wirkstoffen	63
10.1.	Buthionin Sulfoximin	63
10.1.1.	(-)-[1,2-Bis(2-hydroxyphenyl)ethylendiamin] und threo-[1(3-Hydroxyphenyl)2-phenyl-ethylendiamin]dichloroplatin(II)	63
10.1.2.	1,2-Bis(fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe	63
10.2.	Miltefosine.....	64
10.3.	Neopermease	64
VIII.	Schlußfolgerungen	65
IX.	Literatur.....	67
X.	Erklärung	85
XI.	Kopien der zusammengefaßten eigenen Publikationen.....	86

I. EINFÜHRUNG

1. Ursprünge der modernen Krebs-Chemotherapie

Die Entdeckung der frühen Antitumorwirkstoffe erfolgte aufgrund ihrer toxischen Eigenschaften. Unter dem Codenamen HN2 war Stickstofflost (Methyl-bis(2-chlorethyl)aminhydrochlorid) die erste Substanz, die klinisch geprüft wurde [1]. Die Leitverbindung S-Lost (Bis(2-chlorethyl)thioether) wurde schon 1854 synthetisiert [2] und kam im Juni 1917 erstmals als chemischer Kampfstoff unter der Bezeichnung Gelbkreuz zum Einsatz [3]. Neben der typischen Wirkung auf die Haut, an der vorwiegend serös-eitrige Entzündungen und tiefe Nekrosen hervorgerufen werden, schädigt Senfgas die Augen und Atemwege.

Darüber hinaus kommt es durch Resorption der Kampfstoffe vom Losttyp über die Haut und die Schleimhäute dosisabhängig zu allgemeintoxischen Wirkungen am hämatopoetischen und lymphatischen System, an der Magen-Darm-Schleimhaut, den Gonaden und dem Zentralnervensystem [3]. Die Auswirkungen der systemischen Senfgasvergiftung wie Leukozytopenie, Knochenmarksaplasie, Auflösung lymphatischer Organe und Ulzerationen im Gastrointestinaltrakt, also auf Organsysteme, die vorwiegend aus schnell proliferierenden Zelltypen bestehen, wurden von Krumbhaar und Krumbhaar bereits 1919 erkannt [4]. Zwischen den beiden Weltkriegen wurden die chemischen und biologischen Eigenschaften der Lost-Derivate aus militärischem Interesse eingehend untersucht.

1935 machte Berenblum die Beobachtung, daß Senfgas in der Lage war, die Entstehung chemisch induzierter Tiertumoren zu verhindern [5]. Die entscheidende Frage, ob es möglich wäre, Tumorzellen abzutöten, ohne gleichzeitig den Wirt tödlich zu vergiften, wurde aber erstmals von den Pharmakologen Alfred Gilman und Louis S. Goodman an der Yale Universität gestellt. Sie untersuchten die Toxizität und Pharmakokinetik von Stickstofflost nach intravenöser Gabe im Tiermodell und beobachteten Remissionen bei Lymphosarkomen, die in Mäuse implantiert worden waren.

Bald darauf führte im Jahr 1942 Gustav Lindskog in Yale die erste klinische Studie mit Stickstofflost an einem Patienten durch, der an einem schnellwachsenden malignen Lymphom erkrankt war [2]. Dabei kam es zu einer vollständigen, aber nur vorübergehenden Tumorremission. 1943 wurden die Untersuchungen auf den Morbus Hodgkin ausgedehnt. Diese Tumoren sprachen ebenfalls auf die Behandlung an.

Die Folge davon war, daß am Sloan-Kettering Institut in New York ein Krebs-Chemotherapie Programm ins Leben gerufen wurde [6]. Als Bestandteil des "Chemical Warfare Programms" unterlagen diese Studien der strengen Geheimhaltung, so daß die Ergebnisse erst 1946 veröffentlicht wurden [7]. Die Ära der modernen Chemotherapie maligner Tumoren hatte damit begonnen.

2. Stellenwert der Chemotherapie bei der Behandlung maligner Tumoren

Lange Zeit konnten Tumoren nur lokal durch chirurgischen Eingriff oder Bestrahlung behandelt werden. Generalisierte Erkrankungen, wie Leukämien und maligne Lymphome oder Metastasen, die in fortgeschrittenen Stadien der meisten bösartigen Neubildungen das eigentliche Problem darstellen, wurden durch diese Maßnahmen überhaupt nicht erreicht.

Die Entwicklung systemisch wirksamer Arzneimittel führte deshalb zu einer wesentlichen Erweiterung der Möglichkeiten in der Tumorthherapie. Die Chemotherapie maligner Tumoren hat erheblich zur heute erreichten Verbesserung der Behandlungsergebnisse beigetragen. Die positiven Auswirkungen der Chemotherapie spiegeln sich in der relativen Überlebensrate der Krebspatienten wider [8]. Heute beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate in den USA annähernd 50%, in den frühen 60-er Jahren, also vor der Verbreitung der zytostatischen Therapie, war sie mit 40% signifikant niedriger.

Tatsächlich können 12% der Krebsarten des Menschen durch Chemotherapie "geheilt" werden [8]. Unter "Heilung" versteht man in diesem Zusammenhang, daß die Patienten so lange ohne Rückfall leben, daß sich das Rückfallrisiko dem Wert 0 nähert; d. h. solche Patienten weisen nach der Behandlung ihrer bösartigen Erkrankung eine der vergleichbaren gesunden Bevölkerung entsprechende Lebensspanne auf [9]. Aus Gründen der Praktikabilität verzichten jedoch viele Onkologen auf den Ausdruck "kurativ" im strengen Sinne und wählen die Bezeichnung "long-term disease free survival".

Zu den durch Chemotherapie (z. T. in Kombination mit chirurgischen und radiotherapeutischen Maßnahmen) "heilbaren" Tumorformen gehören: Das Chorionkarzinom bei der Frau, akute lymphatische und myeloische Leukämien, M. Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphome von hohem Malignitätsgrad, diffuse histiozytäre Lymphome, Burkitt-Lymphome, Wilms-Tumoren, das Ewing-Sarkom, das embryonale Rhabdomyosarkom, das Retinoblastom bei Kindern, testikuläre Karzinome, Seminome und Mycosis fungoides [8, 9].

Trotz der guten Therapieresultate bei Hämoblastosen und mesenchymalen Tumoren wurden die großen Erwartungen, die in die Chemotherapie gesetzt worden sind, bis jetzt nur teilweise erfüllt [10, 11]. Die erwähnten Tumoren repräsentieren leider nur einen kleinen Anteil der menschlichen Malignome. Die soliden epithelialen Tumoren, d. h. die Karzinome, die den Großteil der Krebserkrankungen ausmachen, sind entweder chemotherapieresistent oder sprechen nur mit einer vorübergehenden Remission auf eine zytostatische Behandlung an [2, 8-10]. Mit anderen Worten: Durch Zytostatika können derzeit nur relativ wenige Patienten geheilt werden, da die häufigsten Krebsarten, wie das metastasierte Mammakarzinom, das Prostata- und Ovarialkarzinom und das Bronchialkarzinom mit den derzeit zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika nicht kurativ behandelt werden können.

3. Klinisch verfügbare Medikamente

Seit ihrer Einführung in die Klinik Mitte der 40-er Jahre hat die Anzahl der kommerziell erhältlichen Arzneimittel im Laufe der Zeit kontinuierlich zugenommen. In den USA sind momentan 42 Wirkstoffe zugelassen [2]. In dieser Zahl sind Wirkstoffe, die zur Behandlung einiger hormonsensitiver Tumoren verwendet werden wie Nebennierenrindenhormone (Cortison, Prednison), Androgene (Testosteron), Östrogene (Diethylstilböstrol), Gestagene (Progesteron) und adrenocorticotropes Hormon (ACTH) nicht enthalten. Hinzu kommen eine Reihe von Substanzen, die sich in den verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung befinden.

Keines der bisher verfügbaren Antitumormittel ist jedoch universell einsetzbar, und einige finden nur bei wenigen, ganz speziellen Krebsarten Anwendung. Beispielsweise kommt Procarbacin hauptsächlich beim M. Hodgkin zum Einsatz, L-Asparaginase ist nur bei der akuten lymphatischen, Busulfan hingegen bei der chronischen myeloischen Leukämie indiziert.

Die Entwicklung neuartiger, spezifisch wirkender und besser verträglicher Medikamente, insbesondere zur kurativen Behandlung solider Tumoren, ist demnach dringend erforderlich.

II. ENTWICKLUNG VON ARZNEIMITTELN FÜR DIE KREBSTHERAPIE

Am National Cancer Institute (NCI) der USA ist das Auffinden und die präklinische Entwicklung neuer Antikrebsmittel Aufgabe des seit 1955 bestehenden Developmental Therapeutic Programms (DTP) innerhalb der Division of Cancer Treatment (DCT) [12]. Die Organisationsstruktur der DCT [13] und die verschiedenen Stadien bei der Entwicklung neuer Medikamente für die Krebstherapie sind in mehreren Übersichtsartikeln ausführlich beschrieben [12-15]. Unter der Bezeichnung "Drug Development" werden im engeren Sinne die einzelnen vorklinischen Stationen zusammengefaßt.

Dieser Begriff wird aber oft umfassender gebraucht, und man versteht darunter alle Phasen der Entwicklung eines Medikaments, von der Entdeckung eines neuen Wirkstoffs bis zur klinischen Prüfung einer entsprechenden Arzneimittelformulierung. Als Synonym wird auch häufig der Ausdruck "Screening Programm" verwendet [12], obwohl das eigentliche Screening nur ein Bestandteil des vorklinischen Entwicklungsprozesses ist. Nach den DCT-Richtlinien ist Screening definiert als derjenige Prozeß, durch welchen eine große Anzahl von Substanzen in experimentellen Testsystemen beurteilt wird.

Die Testsysteme müssen so beschaffen sein, daß die unwirksamen Verbindungen und damit der Großteil der Substanzen, schnell eliminiert werden, um diejenigen Stoffe mit dem höchsten Potential an klinischer Aktivität als wirksam zu erkennen [15].

Diese Definition für Screening impliziert, daß neben den geeigneten Testsystemen auch eine Vielzahl von Testsubstanzen zur Verfügung steht.

1. Herkunft der Substanzen

Wie in der Arzneimittelforschung üblich [16], wird auch bei der Suche nach neuen Antitumorstoffen gleichzeitig nach unterschiedlichen Strategien vorgegangen. Unter den heute in der Klinik verfügbaren Zytostatika befinden sich solche, die durch empirisches Vorgehen beim Screening von Naturprodukten oder Chemikalien entdeckt, und solche, die nach einem rationalen Konzept entwickelt worden sind [14]. Für die 13% der Wirkstoffe, die rein zufällig gefunden wurden [17], ist Cisplatin ein Paradebeispiel [18].

1.1. Screening von Naturprodukten und Chemikalien

Im Rahmen gewaltiger Anstrengungen wurde etwa die Hälfte aller Antitumormedikamente durch systematisches Screening von Pflanzenextrakten, mikrobiellen Fermentationsprodukten (u. a. auch aus tropischem und marinem Material) und synthetischen Substanzen wie Industriechemikalien entdeckt [17].

1.2. Synthese neuer Verbindungen

Bei der durchdachten Entwicklung neuer Wirkstoffe wurden unterschiedliche Wege beschritten:

(I) Einerseits wurden neuartige Substanzen synthetisiert, die entweder in ganz bestimmte Stoffwechselwege der Tumorzellen störend eingreifen oder die Wechselwirkung essentieller körpereigener Stoffe mit Makromolekülen gezielt verändern. Zu diesen Medikamenten gehören die Antimetaboliten und die Steroidhormone, die zusammen 24% der Antitumormittel ausmachen [17].

(II) Andererseits wurden bereits als wirksam erkannte Strukturen chemisch verändert, in der Hoffnung ihre Antitumoraktivität dadurch zu verbessern. Der Anteil der durch Analogsynthesen gewonnenen Chemotherapeutika beträgt zur Zeit 17%. Dazu gehören u. a. Melphalan und Carboplatin [17].

2. Kriterien für die Entwicklung neuer Analoga

An die Synthese und Weiterentwicklung neuer Analoga werden besondere Anforderungen gestellt. Derivate, die von Wirkstoffen abgeleitet sind, welche sich bereits im klinischen Einsatz befinden, sollten sich gegenüber der Leitsubstanz durch mindestens einen der nachstehend aufgeführten Vorteile auszeichnen [15]:

- (I) Erhöhte Aktivität in geeigneten Testsystemen
- (II) Geringere akute und chronische Toxizität
- (III) Breiteres Wirkungsspektrum gegen unterschiedliche Tumormodelle, einschließlich transplantierbarer, chemisch induzierter und spontan entstandener Tumoren

- (IV) Wirksamkeit bei primärresistenten Tumoren oder Verzögerung bzw. Verhinderung der Entwicklung einer Sekundärresistenz
- (V) Bessere pharmakokinetische Eigenschaften, wie länger anhaltende Blut- und Gewebespiegel, vorteilhaftere Formulierung infolge verbesserter Löslichkeit und erhöhte Stabilität oder orale Applizierbarkeit (wenn die Leitsubstanz nur parenteral eingesetzt werden kann)
- (VI) Bessere Kombinationsmöglichkeiten mit anderen Medikamenten oder Bestrahlung
- (VII) Verbesserte antimetastatische Qualität
- (VIII) Niedrigere Mutagenität und Karzinogenität
- (IX) Geringere immunsuppressive Wirkung

Dadurch ist die Vorgehensweise bei der Beurteilung neuer Analoga bereits vorgegeben, so daß ihre vorklinische Prüfung einen Spezialfall darstellt.

III. TESTSTRATEGIEN ZUR AUFFINDUNG UND PRÜFUNG NEUER WIRKSTOFFE

Unabhängig von der Herkunft des zu prüfenden Materials ist letztendlich das Verhalten einer Substanz in präklinischen Testsystemen entscheidend dafür, ob sie als potentiell neues Antikrebsmittel für eine Weiterentwicklung in Frage kommt [12, 14].

Ein Blick auf die historische Entwicklung der am NCI praktizierten Teststrategien und die dafür verwendeten Modellsysteme verdeutlicht die damit verbundenen Probleme. Die Testkonzepte und Testmodelle, mit deren Hilfe Substanzen für die klinische Prüfung ausgewählt wurden, sind seit 1955, dem Erscheinungsjahr des Gellhorn-Hirschberg-Reports, auffällig oft und teilweise sogar grundlegend geändert worden [12-15, 19-35].

1. Grundlagen

Beim erwähnten Gellhorn-Hirschberg-Report [36] handelt es sich um eine umfassende Analyse von in-vitro- und in-vivo-Screeningsystemen zur Beurteilung der Wirkung antineoplastischer Substanzen. Unter den Überschriften "Biochemische Synthese", "Mikrobiologie", "Differenzierung und Entwicklung" und "Experimentelle Tumoren" beinhaltet die Auflistung 74 biologische Testsysteme. Ziel dieser Studie war es, grundlegende Informationen zur Auswahl "geeigneter Screeningsysteme" für das "Drug Development Program" am NCI zu liefern. In diesem Zusammenhang sind zwei Schlußfolgerungen wichtig:

(I) Es gibt keinen Hinweis, daß ein "Tumorsystem" durch ein "Nicht-Tumorsystem" ersetzt werden kann.

(II) Es ist nicht zu erwarten, daß ein einziges Tumormodell ausreicht, um alle Substanzen, die für eine Weiterentwicklung in Frage kommen, als wirksam zu erkennen.

Die logische Folge davon ist, daß die Verwendung eines Spektrums unterschiedlicher Tumoren zu einer entscheidenden Verbesserung des Screeningsystems führt.

2. Teststrategien

Die Vorgehensweise bei der Suche nach neuen, wirksameren Antitumormitteln hängt davon ab, unter welchem Aspekt man Krebs betrachtet. Je nach Betrachtungsweise lassen sich grundsätzlich zwei verschiedene Strategien festlegen [26], die sich aber gegenseitig nicht unbedingt ausschließen und sich wie folgt darstellen:

2.1. Substanzorientierte Testung

Dieses Konzept basiert auf der Vorstellung, daß die außerordentlich komplexen und vielgestaltigen Krebsformen viele zellbiologische und biochemische Gemeinsamkeiten besitzen. Ein Indiz dafür ist z.B. die Tatsache, daß die Hybridisierung von Krebszellen mit normalen Zellen - wie die sog. Hybridomatechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper - fast immer zu entarteten Zellen führt [23]. Die übliche kollektive Krebsdefinition [37] stützt sich ebenfalls auf gemeinsame Malignitätskriterien.

Hinter dem Begriff "substanzenorientiert" steckt die Idee eines gezielten Angriffs der gesuchten Wirkstoffe an Orten, die für alle - oder zumindest die meisten - Krebsarten kennzeichnend sind [26]. Demzufolge beschränkte sich die vorklinische Prüfung neuer Substanzen lange Zeit nur auf ein einziges in-vivo-Tumormodell, die Mäuseleukämien L1210 [14, 20, 27] bzw. P388 [23]. In dieser Extremform entspricht die sog. "substanzenorientierte" Testung nicht der oben diskutierten zweiten Schlußfolgerung aus dem Gellhorn-Hirschberg-Report.

2.2. Krankheitsorientierte Testung

Der Ausgangspunkt für eine "krankheitsorientierte" Arzneimittelentwicklung ist das Vorhandensein biologischer und damit biochemischer Besonderheiten, die mit ganz bestimmten Tumorerkrankungen vergesellschaftet sind [26]. Derartige, für einen Krebstyp spezifische Eigenarten können etwa die Wachstumsregulation [38, 39], den Hormonrezeptorgehalt [40], das Metastasierungsverhalten [41], die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix [42], den Membrantransport von Chemotherapeutika [43, 44] oder die Zytostatikaresistenz [45-47] betreffen. Ein konkretes Beispiel ist die Hormonsensitivität bestimmter Mamma-, Endometrium- und Prostatakarzinome [48].

Die Nutzung solcher, auf ganz bestimmte Krebsformen beschränkter Eigenschaften für die Wirkstoffprüfung sollte zur Auffindung neuer spezifischer Antitumormittel führen.

Für die Praxis bedeutet dies, daß die zu testenden Substanzen nicht nur wie im Falle der "substanzenorientierten" Testung an einem "allgemeinen Tumormodell" wie der L1210- oder P388-Leukämie, sondern schwerpunktmäßig an solchen Tumorarten untersucht werden, die auf eine Substanz oder eine Verbindungsklasse optimal ansprechen.

3. Notwendigkeit zur Verbesserung der Testmethoden

In einem begleitenden Leitartikel zu einer Analyse der Phase-II-Aktivität von 83 zytotoxischen Substanzen [49], deren klinische Prüfung zwischen 1970 und 1985 vom NCI veranlaßt wurde, betont Muggia nochmals ausdrücklich die fehlende Wirksamkeit an soliden Tumoren [50] und schlußfolgert: " ... *one must conclude that the criteria for identifying new drugs for clinical development in the National Cancer Institute screens from 1970 to 1985 are unsatisfactory for the detection of clinically useful drugs against these common human cancers.* "

Für das weitgehende Versagen der bisher verwendeten Testsysteme wurden als Ursachen diskutiert [23, 27, 33]:

- (I) Falsche Vorstellungen über die Zweckmäßigkeit von Mäuseleukämien als allgemeines Modell für alle menschlichen Krebsarten
- (II) Unsicherheiten über die Bedeutung solider Nagertumoren als Bestandteil eines Screeningsystems für die Identifizierung neuer Antitumormittel
- (III) Bevorzugung der verwendeten Tumoren in der Aszitesform und damit Mißachtung der Pharmakokinetik einer Substanz im i.p./i.p.-Modell
- (IV) Verwendung besonders empfindlicher Tumormodelle an Stelle von resistenten Tumoren, welche die klinische Situation bei der Behandlung ekto- und entodermaler Tumoren besser repräsentieren. Die Benutzung allogener Tumoren (z.B. Walker-256-Karzinom, Ehrlich-Aszites-Karzinom und Sarkom-180) erscheinen wegen der Immunreaktionen des Wirts, die gelegentlich auch ohne Behandlung zu spontanen Remissionen führen, aus heutiger Sicht für Screeningzwecke unzuverlässig.

Aufgrund der Unzulänglichkeiten der bisherigen Testsysteme war und ist die kontinuierliche Verbesserung, Weiterentwicklung und Verfeinerung der präklinischen Testmodelle, mit dem Ziel, die klinische Voraussagekraft zu erhöhen, eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung besserer Arzneimittel [14].

IV. Verwendung menschlicher Tumorzelllinien

Wegen der mangelhaften klinischen Prädiktivität der verwendeten Nagertumoren als in-vivo-Modelle für die Therapie epithelialer Tumorerkrankungen wurde das Screening-Programm am NCI vor kurzem durch den Einsatz menschlicher Tumorzelllinien entscheidend umgestellt [22, 24-26, 28-31, 51-53], nachdem man zu der Ansicht gekommen war [14]:

"It is unlikely that a perfect nonhuman model of human cancer will be found ...".

Von den früheren, reinen in-vivo-Systemen unterscheidet sich das neue Konzept prinzipiell dadurch, daß der damalige Eingangstest an der murinen Leukämie P388 durch eine in vitro Testung an einem breit gefächerten Spektrum menschlicher Zelllinien ersetzt wurde. In dieser Zusammenstellung sind jetzt die wichtigsten Arten solider epithelialer Tumoren durch eine Reihe gut charakterisierter, menschlicher Tumorzelllinien repräsentiert. Substanzen, die aufgrund eines selektiven Wirkprofils bei der in-vitro-Testung interessant erscheinen, gehen dann entweder direkt in die klinische Prüfung oder werden vorher noch an thymusaplastischen Mäusen, welche diejenigen Tumorzelllinien tragen, die in vitro auf die Testsubstanz ansprachen, weiter untersucht [54].

Dieser beginnende Wandel der "Testphilosophie" war Ausgangspunkt für die eigenen Untersuchungen. Die gegenwärtigen Entwicklungen am NCI [28, 30, 31, 55] und bei der EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) [35, 56] wurden in der vorliegenden Arbeit besonders berücksichtigt [32-34].

V. Das neue in-vitro-/in-vivo-Konzept

Neben dem Design neuer Wirkstoffe und ihrer Synthese ist die wichtigste Aufgabe der Arzneimittelforschung die Feststellung der Wirkung an Modellen, die der klinischen Situation möglichst nahe kommen. Nur so ist eine Übertragbarkeit der präklinischen Befunde gewährleistet.

Krebschemotherapeutika sind aber nicht in allen Tumormodellen (z. B. Leukämie, Mammakarzinom, Hodenkarzinom) gleich stark wirksam. Sie zeigen häufig eine bevorzugte Wirkung nur gegenüber einem Tumortyp [57].

Diese Beobachtung hat die Arzneimittelforschung ermutigt, den Versuch zu unternehmen, Chemotherapeutika für die Behandlung einer ganz speziellen Krebserkrankung (z. B. Mamma-, Ovarial- und Prostatakarzinom, Malignes Melanom) zu entwickeln.

Seit einigen Jahren stehen für die experimentelle Krebsforschung Tierversuchsmodelle zur Verfügung, bei denen menschliche Tumoren als Transplantate eingesetzt werden [58-60]. Nach Meinung der Experten lassen diese Modelle eher die Voraussage einer Wirkung am Menschen zu, als die bisher benutzten Nagertumormodelle.

Nach unserer Auffassung ist eine erfolgreiche Wirkstoffentwicklung für die Krebstherapie nur dann möglich, wenn sie sich auf eine spezielle Tumorerkrankung konzentriert. Entsprechend dieser neuen Zielsetzung nahmen wir eine Umstellung im Aufbau der Testanordnung vor und etablierten das nachfolgend beschriebene System.

Anstelle eines breiten Spektrums unterschiedlicher Tumorarten wie Leukämien, Lungen-, Nieren-, Colon-, Mamma-, Ovarial-, Prostatakarzinome, Melanome, Tumoren des Zentralen Nervensystems und verschiedene andere mesenchymale und epitheliale Neoplasien [24, 56, 62], verwenden wir für das in-vitro-Testprogramm und die nachgeschalteten in-vivo-Studien in thymusaplastischen Mäusen eine repräsentative Auswahl gut charakterisierter Zelllinien [34, 63-69], die für diejenige Krebsart, zu deren Therapie die Entwicklung eines neuen Wirkstoffs geplant ist, typisch sind [32].

Die in einem solchen Screening-System benutzten Tumormodelle sind histologische Varianten einer Tumorart (z. B. des Mammakarzinoms) [70] und zeichnen sich sowohl in vitro [63-69] als auch in vivo [70] durch unterschiedliches Wachstumsverhalten aus. Gleichzeitig unterscheiden sie sich bezüglich ihrer Resistenz gegenüber klinisch etablierten Therapien.

Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind stabile Zelllinien, standardisierte Chemosensitivitätstests und gut definierte Nacktmausmodelle unabdingbare Voraussetzungen.

1. Tumorbank und Standardisierung der Tumormodelle

Beim Einsatz von Zellkulturtechniken zur Auffindung neuer antineoplastischer Wirkstoffe liegt ein Hauptproblem in der extremen genetischen Variabilität [71,72] der Tumorzellen. Der starke Selektionsdruck durch häufiges Passagieren der Kulturen führt zur Entstehung neuer Subklone, die sich sowohl genotypisch als auch phänotypisch vom Ursprungstumor sehr stark unterscheiden können [73, 74].

1.1. Das Seed-Stock-Konzept

Alle menschlichen Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, Md, USA) bezogen. Um bei Veränderungen der Zelllinien ein Zurückgreifen auf identisches Zellmaterial zu ermöglichen, wurde eine Tumorbank nach dem Seed-Stock-Konzept angelegt [75, 76]. Nach diesem System wird unter fortlaufenden Kontrollen stets auf ein definiertes, kryokonserviertes Ausgangsmaterial zurückgegriffen.

Dazu wurde von folgenden Zelllinien in einer möglichst frühen Passage ein ausreichender Vorrat eingefroren:

Mammakarzinome [63]: MDA-MB-231, MCF-7, T-47-D, ZR-75-1

Ovarialkarzinome [65]: SK-OV-3, NIH-OVCAR-3

Endometriumkarzinome [68]: HEC-1B, RL-75-2

Maligne Melanome [69]: SK-MEL-2, -3, -5, -24, -28

Prostatakarzinome [77]: LNCaP.FGC, DU 145

1.2. Charakterisierung der Zelllinien

Die Kontrollen beinhalten neben mikrobiologischen Routinetests (z. B. dem Nachweis von *Mycoplasmen*) morphologische, zytochemische, immunhistochemische, zytogenetische und biochemische Untersuchungen, sowie die Überprüfung wichtiger Wachstumsparameter und des Ansprechverhaltens auf klinisch etablierte Tumortheraeutika [61]. Die Morphologie der Zellkulturen wird durch Färbungen nach Papanicolaou oder Giemsa dokumentiert. Zur obligatorischen zytochemischen Charakterisierung der Zellen wird die Perjodsäure-Schiff-Reaktion durchgeführt und die Mucicarmin und Sudanschwarz B-Färbung verwendet. Bei den Melanomzelllinien werden zusätzlich die Tyrosinaseaktivität und die Expression des S-100 Proteins verfolgt [69]. Weiterhin werden routinemäßig Wachstumsverhalten, Chromosomenverteilung, Veränderungen des Karyotyps und des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus [34, 63, 64, 68] der Zelllinien verfolgt und das Ansprechverhalten der Zellen auf die für die betreffende Tumorerkrankung klinisch etablierten Chemotherapeutika in vitro und in vivo überprüft [32, 63-70, 77].

Außerdem werden solide Tumoren vor dem Einfrieren histopathologisch definiert und ihre Histologie während der Passagen in der Nacktmaus ständig kontrolliert [70, 78].

2. In-vitro-Methoden zur Beurteilung der Wirkung zytotoxischer Substanzen

In letzter Zeit ist die Anzahl der Publikationen, die sich mit den Einsatzmöglichkeiten menschlicher Tumorzelllinien für die Beurteilung der Wirkung zytotoxischer Substanzen beschäftigen, enorm angewachsen und kaum mehr zu überschauen. Im Folgenden werden hier daher nur jene Techniken angesprochen, die sich in der Therapieforschung durchgesetzt haben und gegenwärtig weit verbreitet sind.

Neben einfacher und kostengünstiger Durchführbarkeit, Schnelligkeit und Flexibilität sollte ein in-vitro-Testsystem zur Auffindung neuer Chemotherapeutika leicht standardisierbar sein und für eine statistische Absicherung der Ergebnisse ausreichende Datenmengen liefern [81].

Die Hauptunterschiede zwischen den beschriebenen Verfahren betreffen einmal die Art und Weise, in der die Zellen kultiviert werden: Als Suspensionskultur, in Weichagar, als "Monolayer" oder Sphäroid; vor allem aber die Parameter, die zur Bewertung und Quantifizierung der Substanzwirkung herangezogen werden [79-85].

Die Kultivierung adhärenter Zellen auf festen Substraten, insbesondere in Mikrotiterplatten, ist diejenige Technik, welche sich durch die größte Flexibilität auszeichnet [84]. Entsprechend vielfältig sind die Methoden, die zur Beurteilung der Schadwirkung eines Stoffes auf die Zellen vorgeschlagen worden sind. Sie reichen von der Bestimmung der Zellzahl mit der Zählkammer oder dem Coulter Counter über die Beurteilung der Unversehrtheit der Zellmembran durch ^{51}Cr -Freisetzung oder den Ausschluß von Trypanblau bis hin zur Messung des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin (Uridin) bzw. Bromdesoxyuridin in DNA (RNA) oder ^3H -Leucin in zelluläres Protein [80-85]. Gelegentlich wird auch das Ausmaß der Metabolisierung von Glukose, gemessen als das von den Zellen freigesetzte ^{14}C - CO_2 , als Kriterium für die Antitumorwirkung benutzt [87, 88]. Auf die Problematik des ^3H -Thymidin-Einbaus und die Fehlermöglichkeiten bei der Verwendung sog. "Vitalfarbstoffe" wurde bereits an anderer Stelle hingewiesen [33, 84].

Anfangs wurden große Hoffnungen in den "Colony-Forming-Assay" [81-85], der am NCI als Eingangstest dienen sollte, gesetzt [22]. Beim Colony-Forming-Assay wird die Fähigkeit der Tumorzellen in Weichagar Kolonien zu bilden, als Zytotoxizitäts-Parameter benutzt. Dieses Verfahren wurde für die geplanten Screeningzwecke wegen technischer Schwierigkeiten und mangelnder Reproduzierbarkeit der Ergebnisse jedoch bald wieder verworfen [8, 90].

Neben den erwähnten prinzipiellen Problemen [33, 34, 63, 84, 89], besteht ein weiterer Nachteil dieser Methoden, die entweder auf dem Vergleich von Zellzahlen, der Bildung von Kolonien in Weichagar [80-84, 90] oder dem Einbau bzw. Metabolismus radioaktiv markierter Verbindungen [84-88] beruhen, darin, daß sie recht umständlich und arbeitsintensiv sind. Daher wurde mit diesen Methoden meist nur eine begrenzte Anzahl von Meßwerten gewonnen, die für eine statistische Absicherung der Ergebnisse selten ausreichten.

Die beschriebenen Schwierigkeiten konnten durch die Entwicklung von Zytotoxizitätstests in Mikrotiterplatten, bei denen zur Quantifizierung der Substanzwirkung verschiedene Farbstoffe verwendet werden, umgangen werden. Mit Hilfe dieser Techniken ist es möglich bei relativ geringem Arbeitsaufwand statistisch gesicherte Daten zu erhalten.

Die Mikrotiterplatten-Tests lassen sich in zwei Kategorien unterteilen, nämlich in solche, bei denen die metabolische Aktivität einer Zellkultur gemessen wird (z. B. Formazan-Test), und solche, die Aussagen über die Reproduktionsfähigkeit einer Zellpopulation erlauben (z. B. Kristallviolett- und Sulforhodamin-B-Test).

Der von Mosmann eingeführte MTT-Test [91] basiert auf der Annahme, daß MTT, ein Tetrazolium-Salz, ausschließlich von vitalen Zellen zum farbigen Formazan reduziert wird, und die Absorption des solubilisierten Produkts der Zellzahl direkt proportional ist. Diese Methode wird gegenwärtig viel eingesetzt [24, 63, 85, 92-94], obwohl ihre unvoreingenommene Anwendung als universell einsetzbarer Zytotoxizitätstest problematisch ist [34, 63].

Zum einen kann die Reduktion des MTT zum Formazan nicht nur in lebenden Zellen stattfinden, sondern auch durch Testsubstanzen mit entsprechendem Redoxpotential oder durch aktive Dehydrogenase, die aus toten Zellen freigesetzt wurde, erfolgen. Dadurch wird eine erhöhte metabolische Aktivität der Zellen vorgetäuscht, d. h. die Hemmwirkung einer Substanz wird unterschätzt [95].

Außerdem kann die metabolische Aktivität der Zellen durch temporäre Phänomene wie z. B. eine Absenkung des Glukosespiegels oder eine Veränderung des pH-Wertes beeinflusst werden, ohne daß die Zellen dadurch nachhaltig geschädigt sind [29]. Entsprechendes gilt natürlich auch für die Verwendung von XTT als Substrat, das nach Reduktion einen wasserlöslichen Farbstoff ergibt [25]. Ein weiterer Nachteil der Formazan-Methoden besteht darin, daß die Farbentwicklung stark zeitabhängig ist, die Absorptionsmessung also sehr schnell, und für jeden Inkubationsansatz separat erfolgen muß.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde zur Erfassung der Proliferation behandelter und unbehandelter Zellkulturen ein wenig störanfälliges, computerunterstütztes Testverfahren in Mikrotiterplatten entwickelt [32-34, 61, 63, 94] und vielfältig eingesetzt [64-69, 78, 96-105]. Diese Methode beruht auf dem Anfärben vitaler, d. h. adhärenter Zellen mit Kristallviolett nach Glutardialdehyd-Fixierung [106, 107].

Inzwischen wurde auch der zeitweilig am NCI favorisierte MTT- bzw. XTT-Assay [24, 25], durch ein dem Kristallviolett-Test analoges Verfahren ersetzt. Dabei wird Sulforhodamin B, ein Farbstoff, der an zelluläre Proteine bindet, verwendet [29, 55, 85, 108, 109].

Mikrotiterplatten-Verfahren mit computergestützter Datenanalyse, bei denen die Reproduktionsfähigkeit einer Tumorzellpopulation durch Anfärben der vorher fixierten Zellen mit geeigneten Farbstoffen wie Kristallviolett oder Sulforhodamin B gemessen wird, erfüllen erstmals folgende Grundanforderungen [32]:

- (I) Reproduzierbare Dosis-Wirkungsabhängigkeit über einen weiten Konzentrationsbereich, welcher die in-vivo-Dosis einschließt
- (II) Linearität zwischen dem gewählten Zytotoxizitätsparameter und der Zellzahl
- (III) Möglichst präzise Voraussage der in-vivo-Effekte aus den in-vitro-Daten

3. Der Kristallviolett-Test

Die von Gillies et al. [106] beschriebene Vorgehensweise wurde an die Erfordernisse der Kultivierung von Zellen in Mikrotiterplatten angepaßt [33, 78, 94, 96] und weiter modifiziert [32, 34, 63, 104, 105]. Untersucht wird das Wachstumsverhalten der Krebszellen in Gegenwart und Abwesenheit von Hemmstoff. Wenn nur die Wachstumskinetik einer Zelllinie gemessen werden soll, wird weder Lösungsmittel noch Wirkstoff [94] zugegeben.

Die Zellen werden als möglichst homogene Suspension im erforderlichen Kulturmedium in 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät. Die optimale Aussaatdichte, bei der die lag-Phase möglichst kurz und die "log-Phase" möglichst lang ist, variiert von Zelllinie zu Zelllinie [63, 94] und wird deshalb stets mikroskopisch kontrolliert. Zur Ermittlung der antineoplastischen Aktivität der Testsubstanzen werden auf jeder Platte neben den behandelten Kulturen Kontrollkulturen mitgeführt, denen nur das jeweilige Lösungsmittel in entsprechender Konzentration zugesetzt wurde. Nach dem bei der Substanzzugabe erfolgten Mediumwechsel wird das Kulturmedium i. d. R. während der gesamten Versuchsdauer nicht mehr erneuert, da durch einen erneuten Medienwechsel bedingte Temperaturänderungen oder Schwankungen des pH-Werts das Zellwachstum vorübergehend hemmen können [34, 63].

Bei Zelllinien beispielsweise, deren Wachstum autokrin reguliert wird, werden beim Erneuern der Nährlösung auch die ins Medium sezernierten Wachstumsfaktoren entfernt.

Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten werden die Kontrollen und die behandelten Zellen nach Entfernen des Kulturmediums mit Glutardialdehyd fixiert. Abgestorbene Zellen haften nicht mehr am Untergrund und werden mit dem Medium vor der Fixierung entfernt. Die fixierten Zellen werden mit PBS überschichtet und bis zum Aufarbeiten des gesamten Versuchsmaterials im Kühlschrank aufbewahrt.

Um Abweichungen durch unterschiedliche Färbebedingungen möglichst gering zu halten, werden am Versuchsende alle Platten auf einmal bearbeitet. Zur Färbung dient Kristallviolett (N-Hexamethylpararosanilin), ein kationischer Farbstoff, der an fixierte, negativ geladene Makromoleküle elektrostatisch gebunden wird [110, 111]. Die Zellkerne werden durch Kristallviolett tief blau-violett, das Zytoplasma nur schwach blau angefärbt. Nachdem überschüssige Farbe durch Wässern der Zellen entfernt worden ist, wird das an Zellbestandteile gebundene Kristallviolett mit 70%-igem Ethanol herausgelöst und photometrisch vermessen. Die Extinktion der Kristallviolett-Lösungen korreliert sehr gut mit der Zellzahl [33, 106, 107]. Die ursprünglich von Gillies et al. [106] verwendete Extraktionslösung (0.2%-iges Triton X-100) wurde durch 70%-iges Ethanol ersetzt, weil damit der Farbstoff schneller aus den Zellen gelöst wird, und die Farbintensität der Lösung wesentlich länger stabil bleibt. Dadurch wird das Extinktionsmaximum von 598 nm auf 592 nm verschoben. Da das Absorptionsmaximum aber sehr breit ist, liefert auch die aus gerätetechnischen Gründen notwendige Messung bei 578 nm sehr gute Ergebnisse.

Nach der Datenübertragung vom ELISA-Reader auf einen PC erfolgt die Auswertung mit Hilfe eines hierfür entwickelten Rechenprogramms [34, 94, 112].

Im Gegensatz zum MTT-Assay bleiben die Strukturen der Zellen beim Kristallviolett-Test durch die Fixierung erhalten. Dadurch kann im Anschluß an die quantitative Auswertung auch die Zellmorphologie beurteilt werden. Dazu werden die Zellen nach der Extinktionsmessung entweder mit Ethanol vollständig entfärbt oder, eventuell sogar mit unterschiedlichen Farbstoffen, neu gefärbt.

3.1. Bestimmung von Wachstumskurven und Verdopplungszeiten

Obwohl verschiedene Techniken zur Bestimmung der Zellproliferation beschrieben worden sind, scheint an der genauen Analyse der gemessenen Wachstumskurven relativ wenig Interesse zu bestehen. Meist wird die Generationszeit einer Zellpopulation einfach graphisch aus der vermeintlich exponentiellen Wachstumsphase [53] abgeschätzt oder aus den Zellzahlen am Anfang und am Ende des Versuchs [74, 113] extrapoliert.

Eine Abgrenzung der verschiedenen Wachstumsphasen ist dadurch aber nicht möglich. Vielmehr wird ohne genauere Überprüfung davon ausgegangen, daß auch Krebszellen, unabhängig von den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen, in Kultur ideales exponentielles Wachstum aufweisen.

Die von uns entwickelte Methode erlaubt es, durch computerunterstützte Auswertung kolorimetrischer Daten die exakte Verdopplungszeit zu jedem Zeitpunkt eines Versuches anzugeben [94, 97, 98]. Eine Auftragung der Verdopplungszeit gegen die Inkubationszeit liefert eine eindeutige Abgrenzung der einzelnen Wachstumsphasen und somit ein Maximum an Information. In der gewählten Auftragung ist exponentielles Zellwachstum durch einen zur Zeit-Achse parallelen Kurvenverlauf gekennzeichnet.

Exponentielles Wachstum im Sinne der Definition wurde bei keiner einzigen Tumorzelllinie (Mamma-, Ovarial, Endometrium-, Prostatakarzinome, Maligne Melanome) beobachtet [34, 63-69, 77, 94]. Nach unterschiedlich langen lag-Phasen wuchsen die unbehandelten Kulturen - je nach Tumortyp - höchstens zwei Generationen lang "annähernd exponentiell". Die Generationszeit ist also keine für die jeweilige Zelllinie charakteristische konstante Größe, sondern sie ändert sich während der Wachstumszeit ständig.

Dieses überraschende Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen anderer Autoren [114, 115] überein. Deren Analyse des Wachstumsverhaltens von 125 verschiedenen Zelllinien ergab, daß Säugerzellen vorwiegend nicht-exponentiell wachsen.

Dennoch wird bei der Durchführung von Chemosensitivitätstests meistens von exponentiellem Wachstum ausgegangen [53, 74, 92]. Shekan und Friedman führen diesen Irrtum auf methodische Artefakte bei der graphischen Auswertung der Wachstumskinetiken zurück [114].

3.2. Kinetischer Chemosensitivitätstest

Wichtige Parameter eines Chemosensitivitätstests wie die Aussaatdichte, die Kulturbedingungen, die Dauer der Substanzeinwirkung, die Dauer der substanzfreien Inkubation nach der Substanzexposition und v. a. die Methode zur Quantifizierung der Substanzwirkung variieren für die gebräuchlichen Assays [22, 24, 25, 29, 53, 55, 80-93, 95, 107-109, 113, 116] erheblich. Deshalb ist ein Vergleich von Substanzwirkungen auf der Grundlage von T/C- und den daraus errechneten IC_{50} -Werten insbesondere dann extrem schwierig, bzw. unmöglich, wenn sie mit den herkömmlichen Testverfahren aus Einzelpunkte-Messungen an unterschiedlichen Zelllinien gewonnen worden sind [34].

3.2.1 Endpunktmessung versus Verfolgen der Wachstumskinetik

In ihrer klassischen Arbeit "Comparison of *in Vitro* Methods to Determine Drug-induced Cell Lethality" kommen Roper und Drewinko zu dem Schluß: "*In proliferating cell populations, the inability to reproduce indefinitely is the only criterion to assess cell lethality*" [89]. Anders ausgedrückt: Das Entscheidende ist also das Proliferationsverhalten einer Tumorzellpopulation und nicht etwa ihre Fähigkeit zur Metabolisierung eines bestimmten Substrats zu einem willkürlich gewählten Zeitpunkt der Wachstumskurve. Da die Substanzwirkung von der Wachstumsphase, in der sich die Zellen gerade befinden, abhängen kann [57, 117, 118], ist die genaue Kenntnis der Wachstumskurve der Kontrollkulturen für den Vergleich von Substanzwirkungen an unterschiedlichen Zelllinien sehr wichtig [34].

Finlay und Bagulay haben zwar versucht, unterschiedliche Verdopplungszeiten verschiedener Zelllinien dadurch auszugleichen, indem sie die Dauer des Versuches auf die jeweilige Zelllinie abstimmten [53], aber trotzdem werden fast alle Chemosensitivitätstests als Endpunktsbestimmungen durchgeführt [22, 24, 25, 55, 80-93]. Dabei ist weder die Wachstumsphase der Kontrollkulturen zum Zeitpunkt der Messung bekannt, noch werden Unterschiede im Wachstumsverhalten bei der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien berücksichtigt.

Obwohl meist ausdrücklich betont wird, daß Chemosensitivitätstests mit exponentiell wachsenden Kulturen durchgeführt werden, wurde - wie bereits erwähnt - bei den eigenen Untersuchungen eine längere exponentielle Wachstumsphase bei keiner Zelllinie beobachtet. Dennoch variieren diejenigen Wachstumsparameter einer Zellpopulation, welche die Wirkung antineoplastischer Substanzen beeinflussen können, wie z. B. die Dauer der lag- und "log"-Phase, die Verdopplungszeit sowie das Einsetzen der Plateau-Phase und die dabei erreichte Zelldichte sowohl zwischen verschiedenen Zelllinien als auch innerhalb einer Linie aufgrund unterschiedlicher Kulturbedingungen oder infolge der genetischen Instabilität der Tumorzellen.

Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wird bei dem entwickelten Chemosensitivitätstest die Wachstumskinetik der Kontrollkulturen mit den zugehörigen Verdopplungszeiten in jedem Experiment bestimmt [34]. Beim kinetischen Chemosensitivitätstest werden durch einen Wirkstoff bedingte Änderungen im Proliferationsverhalten im Vergleich mit der Wachstumskinetik der Kontrollkulturen beurteilt. Dadurch erhält man genauere Informationen über die Wirkung einer Substanz und kann Substanzwirkungen an Zelllinien mit unterschiedlichem Wachstumsverhalten vergleichen. Eine eventuelle Erholungsphase anfänglich geschädigter Zellen bzw. die Entstehung resistenter Subpopulationen wird in einer solchen Versuchsanordnung ebenfalls erfaßt.

3. 2. 2. Quantifizierung der Substanzwirkung

Bereits 1975 stellten Freshney et al. fest, daß IC_{50} -Werte u. a. von der Aussaatdichte der Kulturen abhängen [86]. Durch Einbeziehen der Ausgangszelldichte in die Berechnung der T/C-Werte können zytozide Substanzwirkungen von zytostatischen Effekten eindeutig unterschieden werden [34, 63]. Eine Auftragung der korrigierten T/C-Werte gegen die Inkubationszeit erleichtert die Einordnung von Wirkstoffen erheblich, da vorübergehende Effekte sofort als solche erkannt, und dosisabhängige Wirkungsabstufungen auf einen Blick erfaßt werden.

Soll auch das Ausmaß des zytoziden Effekts exakt angegeben werden, dann muß der Netto-Zuwachs der behandelten Zellen auf die Ausgangszelldichte normiert werden [34, 63, 105, 119], da der Zelltod ja unabhängig vom Wachstum der Kontrollen eintritt. Für solche Versuche ist es sinnvoll, bereits "hochgewachsene" Kulturen mit den Testsubstanzen zu inkubieren [105].

Die enormen Datenmengen, die beim Screening mit computergestützten kolorimetrischen Testverfahren anfallen, bereiten einige Schwierigkeiten bei der Präsentation der Ergebnisse. Deshalb wird am NCI zur Zeit viel an einer übersichtlichen Darstellung zur Bewertung der Wirkung von Antitumormitteln gearbeitet [55]. Eine ideale Lösung scheint bisher noch nicht gefunden worden zu sein, so daß Substanzwirkungen entweder als sog. "Mean-Graph" [120] oder in der oben beschriebenen Weise dargestellt werden [55]. Da aber der am NCI durchgeführte Sulforhodamin-B-Test auf einer Endpunktmessung beruht, erfolgt die Auftragung der Wirkung nicht wie beim kinetischen Chemosensitivitätstest gegen die Inkubationszeit sondern gegen den Logarithmus der Substanzkonzentration [55].

4. In-vitro-Pharmakologie

Zur Erstellung eines optimalen Dosierungsschemas für den eventuell sich anschließenden Tierversuch [32] werden in verschiedenen Konzentrationen diejenigen Einwirkzeiten, die zu zytotoxischen Effekten führen, im Zellkulturexperiment ermittelt [63, 65, 101-104].

Zur Verbesserung der in-vitro-/in-vivo-Korrelation werden die Testsubstanzen bezüglich konkurrierender Inaktivierungsprozesse wie z. B. Bindung an Serumalbumin [102, 121] oder der Reaktion mit Bionukleophilen (insbesondere bei Alkylantien und Platinkomplexen) durch unterschiedlich lange Vorinkubation im Kulturmedium untersucht [63, 65, 101-104]. Durch dieses Vorgehen soll der Einfluß von Inaktivierungsprozessen, die im Organismus beim Transport des Wirkstoffs zum Tumor stattfinden, erfaßt werden.

Unter diesen Voraussetzungen kann festgestellt werden, ob eine antineoplastische Wirkung in klinisch relevanten Konzentrationen erreicht wird. Applikationsart, Einwirkzeit und Dosierungsintervall werden so in vitro optimiert. Nach kritischer Analyse aller vorliegenden in-vitro-Daten kommen z. B. bei den Cisplatin-Analoga nur noch ca. 1 % der synthetisierten Substanzen für eine in-vivo-Testung in Frage [32, 122]. Die Tierversuche werden dann mit den optimierten Therapieplänen unter geringstmöglicher Belastung der Nacktmäuse durchgeführt.

Inzwischen konnte an unterschiedlichen menschlichen Tumormodellen in der Nacktmaus (Mamma- und Endometrium-Karzinom, Malignes Melanom) gezeigt werden, daß bei Anwendung der oben dargestellten in-vitro-Teststrategie präzise Voraussagen der in-vivo-Ergebnisse möglich sind [32, 70].

An dieser Stelle muß aber ausdrücklich betont werden, daß Verbindungen, die erst nach Aktivierung im Organismus ihre Wirkung entfalten, beim in-vitro-Screening nicht erkannt werden. Zu diesen sogenannten Prodrugs gehört beispielsweise Dacarbazin, und eines der wichtigsten Krebschemotherapeutika, das Cyclophosphamid.

5. Tumoren in der thymusaplastischen Maus

Die Haltung und Zucht von thymusaplastischen NMRI Mäusen erfolgt im wesentlichen nach den von Fortmeyer eingeführten Methoden [123]. Über die Zuchtergebnisse im Tierversuchslabor der Universität Regensburg seit 1987, die Etablierung, die Eigenschaften und die Einsatzmöglichkeiten der in der Nacktmaus und der Nacktratte vorhandenen Tumormodelle wird an anderer Stelle ausführlich berichtet [124].

Zur Zeit stehen für die Wirkstoffprüfung in vivo die folgenden menschlichen Tumoren zur Verfügung:

Mammakarzinome: MDA-MB-231, MCF-7, ZR-75-1 [32, 96, 102, 125]

Ovarialkarzinome: SK-OV-3, NIH-OVCAR-3 [65, 126, 127]

Endometriumkarzinome: HEC-1B, RL-75-2 [68]

Prostatakarzinom: LNCaP.FGC [70]

Schilddrüsenkarzinom: ONCO-DG 1 [128]

Maligne Melanome: SK-MEL-2, -3, -5, -24, -28 [69]

Um die Versuchsanordnung möglichst realistisch zu gestalten, wird - falls irgend möglich - mit orthotopen Modellen gearbeitet. Die Tumoren werden dazu nicht stereotyp subkutan oder unter die Nierenkapsel transplantiert, sondern es wird versucht, unterschiedliche Tumortypen in ihrer "physiologischen" Umgebung wachsen zu lassen, also beispielsweise Mammakarzinome in der Milchleiste [125], Ovarialkarzinome im Ovar [126] und Endometriumkarzinome im Uterus [124]. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß der sog. Nierenkapsel-Assay am NCI wieder aufgegeben wurde [8, 90].

Was nun die Platinkomplexe betrifft, so ist für deren Bewertung neben der Wirksamkeit im Nacktmausmodell, die therapeutische Breite [129] im Vergleich zur Leitverbindung Cisplatin ausschlaggebend.

VI. Platinkomplexe als Zytostatika

Die besondere Bedeutung, die Cisplatin bei der Chemotherapie maligner Tumoren zukommt, die Anstrengungen bei der Suche nach wirksameren, weniger toxischen Platinkomplexen, und die Hoffnungen, die immer wieder in die neuen Entwicklungssubstanzen gesetzt wurden, spiegeln sich in der Literaturflut wieder, die in den letzten Jahren zu diesem Thema veröffentlicht wurde. Einschlägige Monographien und Reviews geben einen guten Überblick über die neueren Entwicklungen auf diesem Gebiet [130-140].

1. Cisplatin und Carboplatin

Gegenwärtig ist cis-Diammindichloroplatin(II) (Cisplatin) eines der wirksamsten Zytostatika und damit ein wichtiger Bestandteil vieler Standard-Therapie-Schemata bei der Behandlung solider Tumoren [57, 141]. Es wird vorwiegend in Kombination mit anderen Zytostatika eingesetzt.

Hauptindikationen sind Hoden- und Ovarialkarzinom; darüber hinaus wird Cisplatin aber auch beim Endometrium-, Zervix-, Blasen- und kleinzelligen Bronchialkarzinom sowie bei Tumoren des Gastrointestinaltrakts, Neubildungen im Hals-Kopf-Bereich und Weichteilsarkomen eingesetzt [57]. Insbesondere Seminome können - selbst wenn sie sich bereits in weit fortgeschrittenen Stadien befinden - zu einem hohen Prozentsatz geheilt werden [142]. Beim Ovarialkarzinom werden mit Cisplatin häufig gute, wenn auch nur zeitlich begrenzte, Ergebnisse erzielt [101, 143].

Vereinzelt wird auch über objektive Remissionen bei malignen Tumoren der HNO-Region, der Blase, des Gebärmutterhalses und sogar beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom berichtet [144].

Neben Cisplatin wird Carboplatin (Diammin(1,1-cyclobutandicarboxylato)platin(II)) in der Klinik routinemäßig verwendet. Unabhängig von den unterschiedlichen Indikationen, für die Carboplatin in den verschiedenen Ländern zugelassen ist, entspricht sein Wirkungsspektrum genau dem von Cisplatin, d. h. Carboplatin ist unwirksam bei Tumoren die gegenüber Cisplatin entweder primär resistent sind, oder aber im Verlauf der Therapie eine sekundäre Resistenz entwickelt haben [57, 144].

2. Struktur und Reaktivität

Mit der Kernladungszahl 78 steht Platin in der VIII. Nebengruppe des Periodensystems, unter Nickel und Palladium, die ihrerseits mit den Ordnungszahlen 28 und 46 analoge Plätze in der ersten bzw. zweiten Periode einnehmen. Die drei Elemente besitzen folgende Elektronenkonfiguration: Ni: [Ar] $3d^8 4s^2$, Pd [Kr] $4d^{10}$ und Pt: [Xe] $4f^{14} 5d^9 6s^1$.

Aufgrund der gemeinsamen d^8 -Konfiguration in der Oxidationsstufe +II verhalten sich zwar Platin, Palladium und Nickel i. a. chemisch recht ähnlich [145], aber im Gegensatz zu Platin besitzen Ni- und Pd-Verbindungen keine oder nur sehr schwache Antitumoraktivität [138]. Bei der Mehrzahl der Palladium(II)- und Platin(II)-Komplexe ist das Zentralion dsp^2 -hybridisiert, die Komplexe besitzen daher eine quadratisch-planare Struktur [145, 146].

Obwohl die Radien d^8 -konfigurierter Pd- und Pt-Ionen wegen der effektiven Abschirmung der Kernladung durch die 14 f-Elektronen des Platins exakt gleich groß sind, sind quadratisch-planare Pt-Komplexe kinetisch relativ inert und thermodynamisch verhältnismäßig stabil [145]. Sie reagieren etwa 10^6 -mal langsamer als ihre Pd-Homologen [146]. Wegen der größeren räumlichen Ausdehnung der 5s-Orbitale des Platins im Vergleich zu den 4s-Bahnfunktionen des Palladiums sowie der stärkeren Polarisierbarkeit der Außenelektronen, ist beim Platin der kovalente Bindungsanteil größer, die Koordination von Liganden entlang der Raumachsen erschwert und die Geschwindigkeit von Substitutionsreaktionen dadurch verlangsamt.

Diese Eigenschaften, also die Fähigkeit zur Ausbildung stabiler Bindungen definierter Länge und Orientierung, sind die Voraussetzungen für die stereospezifische Reaktion von Platinkomplexen mit Biomolekülen und Ursache einer Antitumorwirkung.

Platin(II) bildet zwar mit nahezu allen Nichtmetallen sowohl mit Sigma- als auch mit Pi-Elektronendonatoren Komplexe, doch sind Verbindungen mit schwereren Elementen meist stabiler. Deshalb wird Platin manchmal auch als Metall vom B-Typ bezeichnet [146]. Der Grund für die stärkere Bindung der schweren Elektronendonatoren ist in hohem Maße die Bildung von Metall-Ligand-Pi-Bindungen durch Überlappung besetzter d_{xz} -, d_{xy} - und d_{yz} -Orbitale des Zentralions mit unbesetzten d_{pi} -Bahnfunktionen der Liganden [145]. Bei den Liganden handelt es sich i. d. R. um Anionen oder neutrale Verbindungen.

Dies schließt aber die Existenz thermodynamisch stabiler Koordinationsverbindungen des Platins mit den Elementen der ersten Periode keineswegs aus und erlaubt auch keinerlei Aussagen über das kinetische Verhalten der entsprechenden Komplexe. Aus dem Vergleich von Komplexbildungskonstanten kann man die relative Affinität der Liganden zum Pt(II) angeben. Sie nimmt in der Reihenfolge: $\text{CN}^- > \text{NH}_3 = \text{OH}^- > \text{I}^- > \text{SCN}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > > \text{F}^- = \text{H}_2\text{O} = \text{MeOH}$ ab.

Obwohl trans-Isomere i. a. stabiler sind als die entsprechenden Komplexe mit den Liganden in cis-Stellung, ist ihre Bildung kinetisch kontrolliert.

Die thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften der quadratisch-planaren Platin(II) bzw. der d^2sp^3 -hybridisierten oktaedrisch koordinierten Platin(IV)-Komplexe sowie deren chemische Reaktionen in wässriger Lösung sind in den Arbeiten von Lippert & Beck [132], Howe-Grant & Lippard [146], Abrams [147] und der dort zitierten Literatur ausführlich abgehandelt.

Komplexe mit Liganden, welche 5-oder 6-gliedrige Chelatringe ausbilden können sind energetisch besonders begünstigt. Der Grund für diesen sog. Chelat-Effekt ist überwiegend entropischer Natur [145].

2.1. Voraussetzungen für die Antitumorwirkung

Bei der Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen mehrerer tausend, im Tierversuch getesteter Platin-Komplexe [148, 149] erkannte man eine Reihe von Gemeinsamkeiten, die anscheinend Voraussetzung für eine Antitumorwirkung sind. Klare und einfache Verknüpfungen ergaben sich dabei nur in Ausnahmefällen [150], da die Daten an verschiedenen Modellen (L1210 und P388 Mäuseleukämie, Sarkom 180, ADJ/PC6 Plasmozytom der Maus etc.) mit unterschiedlichen Behandlungsschemata gewonnen wurden, so daß ein Vergleich der relativen Wirksamkeiten schwierig ist. Dennoch können für Cisplatin-Analoga einige empirische Grundregeln aufgestellt werden:

2.1.1. Zusammensetzung und Raumstruktur wirksamer Cisplatin-Analoga

Da Antitumoraktivität vorwiegend für Pt(II)-Verbindungen des Typs $[\text{PtL}_2\text{A}_2]$ bzw. $[\text{PtL}_2\text{AB}]$ beschrieben wurde, soll Platin(II) quadratisch planar koordiniert sein [131, 132, 150].

Wirksame Platin(IV)-Komplexe haben die Zusammensetzung $[\text{PtL}_2\text{A}_4]$, $[\text{PtL}_2\text{A}_2\text{B}_2]$ oder $[\text{PtLL}^*\text{A}_2\text{B}_2]$ und Oktaeder-Struktur [132, 139]. L und L* symbolisieren die sog. Nicht-Abgangsgruppe und stehen für einen kinetisch inerten, relativ fest gebundenen Liganden, der häufig ein Amin ist. A und B repräsentieren die Abgangsgruppen, d. h. leicht austauschbare Liganden. Bei der Leitverbindung Cisplatin ist der Neutralligand, NH_3 die Nicht-Abgangsgruppe und Cl^- die Abgangsgruppe.

2.1.2. Bedeutung der Abgangsgruppe

Die Abgangsgruppen sollen nicht zu leicht austauschbar, aber auch nicht zu fest gebunden sein [132], sie sollten sich in cis-Stellung befinden und einen optimalen Abstand von ungefähr 3 Å haben [131, 138]. Wird L konstant gehalten, so bestimmt die Abgangsgruppe die Substitutionsgeschwindigkeit mit Bionukleophilen und damit die Antitumorwirkung [132, 146, 150]. Bei der Variation der Abgangsgruppen wird bei Chlorid häufig die höchste Aktivität gefunden [132].

Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit von Cisplatin (0.253 g/100 g bei 25 °C [151]) und gleichzeitiger Verringerung der Nephrotoxizität wurden die Chloridionen im Cisplatin durch andere Abgangsgruppen, v. a. Carboxylate ersetzt [134, 136, 150]. Zu fest gebundene Abgangsgruppen führen jedoch zu kinetisch inerten Komplexen und daher zu einer Verminderung oder einem Verlust der Antitumorwirkung [121, 132, 150]. Der zweizählige Ligand 1,1'-Cyclobutandicarboxylat ist in dieser Hinsicht eine Ausnahme [121], so daß zur Erklärung des Zustandekommens der zytotoxischen Wirkung bei solchen Komplexen eine enzymatische Abspaltung der Abgangsgruppe vorgeschlagen wurde [147, 150].

2.1.3. Bedeutung der Konfiguration

Im Gegensatz zur früheren Ansicht, daß ausschließlich Platinkomplexe mit cis-Konfiguration an Tumoren wirksam sind [131, 152, 181], wurde in letzter Zeit auch über Antitumoraktivität von "trans-Komplexen" [139, 140, 153, 154] und solchen, die mit Biopolymeren nur Monoaddukte bilden können [100, 139, 140, 149], berichtet. Zur Beurteilung der Bedeutung dieser Befunde muß noch eingehend geprüft werden, ob es sich dabei um spezifische antiproliferative Wirkungen oder um unspezifische toxische Effekte wie bei trans-Dichlorobis(cycloheptylamin)- und trans-Dichlorobis(cyclooctylamin)platin(II)-Komplexen handelt [105].

2.1.4. Bedeutung der Nicht-Abgangsgruppe

Da die Nicht-Abgangsgruppe definitionsgemäß relativ stabil gebunden ist, bestimmt sie in erster Linie das pharmakokinetische Verhalten eines Platin-Komplexes sowie dessen Durchtritt durch die Zellmembran. Sie ist aber auch an Wechselwirkungen mit der DNA beteiligt und moduliert daher sowohl die Antitumorwirkung als auch die Toxizität eines Cisplatin-Analogons.

Angesichts dieser Tatsache liegt die Überlegung nahe, Platin-Komplexe über entsprechende Liganden selektiv in die Tumorzellen einzuschleusen und dadurch eine spezifische Wirkung zu erzielen, ohne daß andere schnell proliferierende Gewebe gleichzeitig geschädigt werden. Obwohl gemäß diesem Drug-Targeting-Konzept weltweit eine Vielzahl von Verbindungen mit den verschiedensten Liganden synthetisiert und vorklinisch, z. T. aber auch schon klinisch, geprüft worden ist [100-102, 130-140, 144, 148-150, 155-160], haben sich die in sie gesetzten Erwartungen bisher nur in sehr beschränktem Ausmaß erfüllt.

Handelt es sich bei L um ein Amin, dann nimmt die Antitumorwirkung bei der Variation des Liganden vom primären zum sekundären Amin bei konstanter Abgangsgruppe stark ab [155]. Komplexe mit tertiären Aminen sind unwirksam [150]. Aus quantitativen Struktur-Aktivitätsbeziehungen (QSAR) wurde ebenfalls abgeleitet, daß mindestens ein Wasserstoffatom am Stickstoff für die Wirkung erforderlich ist [161, 182, 187].

Möglicherweise sind bei der Wechselwirkung von Platinkomplexen mit der DNA auch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Amin und polaren Gruppen der Basen beteiligt. Diese Annahme stimmt auch mit den Ergebnissen neuerer Molekülmechanik-Rechnungen überein [150, 162].

2.1.5. Bedeutung der Ladung

In früheren Arbeiten wurde die Elektroneutralität von Platinkomplexen als allgemeine Voraussetzung für Antitumorwirkung angesehen [131, 132], vermutlich weil lipophile ungeladene Moleküle leichter durch die Zellmembran ins Zytoplasma diffundieren. Inzwischen gibt es zahlreiche Beispiele für die Wirksamkeit anionischer [150] und v. a. kationischer Platinkomplexe [102, 163-170] sowie für deren Membrantransport und Anreicherung in Tumorzellen [104, 121, 171].

2.1.6. Bedeutung der Oxidationsstufe

Obwohl Pt(IV)-Verbindungen i. d. R. weniger aktiv sind als die entsprechenden Pt(II)-Analoge [150], waren sie ursprünglich v. a. wegen ihrer relativ guten Wasserlöslichkeit [136, 150] trotzdem von Interesse. Im Gegensatz dazu wurden kürzlich lipophile Pt(IV)-Dicarboxylate mit Ammin/Amin-Liganden beschrieben, die nach p. o. Gabe gut resorbiert werden [139, 172] und zusätzlich das Wachstum Cisplatin-resistenter Ovarialkarzinom-Zelllinien hemmen [159, 160].

Höchstwahrscheinlich werden Pt(IV)-Verbindungen in vivo zuerst zu den entsprechenden Pt(II)-Derivaten reduziert [136], da Pt(IV)-Komplexe ohne vorherige Reduktion nicht mit DNA reagieren können [150]. Als Reduktionsmittel unter physiologischen Bedingungen wurden Cystein [150], Ascorbinsäure [139, 147] und Fe^{2+} [147] vorgeschlagen.

2.2. Austauschreaktionen mit Nukleophilen

Die biologische Wirkung von Platinkomplexen beruht auf Austauschreaktionen, die dazu führen, daß das Platin stabil an bestimmte, für die Zelle essentielle Biomoleküle gebunden wird [138]. Die Kinetik der Substitutionsreaktionen an quadratisch-planaren Platin(II)-Komplexen, die - wie bereits erwähnt - kinetisch relativ inert sind, ist gut untersucht [132, 146, 173-177]. Diese Komplexe können prinzipiell sowohl mit Elektrophilen als auch mit Nukleophilen reagieren. Die elektrophile Substitution erfolgt aufgrund der hohen Elektrodensichte der d-Orbitale des Platins, der nukleophile Angriff infolge der positiven Ladung am Zentralion [146].

Im Folgenden werden nur diejenigen Aspekte nukleophiler Substitutionsreaktionen, die für die Antitumorwirkung der Cisplatin-Analoga von zentraler Bedeutung sind, angesprochen. Substituiert wird i. d. R. die Abgangsgruppe, in den meisten Komplexen ein anionischer Ligand [132], unter Retention der Konfiguration, d. h. aus einer cis-konfigurierten Verbindung entsteht im Gegensatz zu den klassischen Alkylantien wieder eine cis-Verbindung, aus einem "trans-Komplex" das entsprechende Derivat mit trans-Konfiguration [138, 150]. Kinetische Untersuchungen liefern indirekte Hinweise auf einen assoziativen Mechanismus über einen 5-bindigen Übergangszustand [132, 146, 185]. Aus dem negativen Vorzeichen und der Größe des Aktivierungsvolumens der Substitutionsreaktion kann auf die Ausbildung einer Bindung im Übergangszustand geschlossen werden.

Dabei entsteht eine d^2sp^2 -hybridisierte Zwischenstufe mit trigonal-bipyramidaler Struktur. Berechnungen mit Hilfe der MO- und der Ligandenfeld-Theorie bestätigen diese Annahme [146].

Vereinfacht dargestellt hängt die Geschwindigkeit der Substitution der Abgangsgruppe durch einen anderen Liganden ab von:

(I) den Eigenschaften und der Konzentration des eintretenden Nukleophils.

Von Bedeutung sind dabei seine Polarisierbarkeit, also das Ausmaß des Ionencharakters sowie das Verhältnis der Sigma- und Pi-Bindungsanteile bei der Wechselwirkung des eintretenden Nukleophils mit dem Platin. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt gemäß $\text{H}_3\text{COH} < \text{H}_3\text{CCOO}^- < \text{Cl}^- < \text{NH}_3 < \text{Imidazol} < \text{Br}^- < \text{S}(\text{CH}_3)_2 < \text{I}^-$ zu [132, 146].

(II) der Art des austretenden Liganden.

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang der sog. kinetische trans-Effekt, der manchmal auch als labilisierender trans-Effekt bezeichnet wird, ein Phänomen, das hauptsächlich bei quadratisch planaren Komplexen von Bedeutung ist [145]. Auf die vielfältigen Erklärungsmöglichkeiten seines Zustandekommens und seiner Ursachen [178] wird hier nicht weiter eingegangen, sondern es wird nur das Phänomen als solches dargestellt.

Der kinetische trans-Effekt unterscheidet sich vom thermodynamischen trans-Einfluß dadurch, daß er sich nicht wie der zuletzt genannte auf den Komplex im Grundzustand bezieht, sondern die Verhältnisse im Übergangszustand oder bei der Reaktion der trigonal-bipyramidalen Zwischenstufe beschreibt. Der trans-Einfluß hilft vorausszusagen, bei welchem Liganden es sich um die potentielle Abgangsgruppe handelt. Der kinetische trans-Effekt gibt an, wie schnell dieser Austritt erfolgt. Diese beiden Effekte können, müssen aber nicht unbedingt zusammenhängen [146].

Bei der Auswertung kinetischer Daten aus vielen Arbeiten wurde folgende Abstufung gefunden: S-Donatoren $> \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{NH}_3 > \text{OH}^- > \text{H}_2\text{O}$ [132, 146]. Iodid wirkt also viel stärker trans-dirigierend als beispielsweise Ammoniak.

2.2.1. Solvolyseprodukte und Reaktionen mit niedermolekularen Liganden

Zwar kann in seltenen Fällen ein Chlorid im Cisplatin möglicherweise durch einen direkten Angriff eines Makromoleküls substituiert werden [138], es wird aber allgemein angenommen, daß Platinkomplexe vorher zumindest teilweise hydrolysieren, und die Hydrolyseprodukte die eigentlich aktiven Substanzen darstellen [132, 136, 138, 150].

Je nach pH-Wert der Lösung und Konzentration der Chloridionen können 5 monomere Hydrolyseprodukte des Cisplatins entstehen. Das Hydrolysegleichgewicht wird zusätzlich dadurch kompliziert, daß sich bei entsprechendem pH-Wert schnell Hydroxo-verbrückte Oligomere bilden [132, 138, 147, 179, 180, 182].

Prinzipiell lassen sich bei Kenntnis der pK_a -Werte der Aqua-Liganden und der Gleichgewichtskonstanten die Anteile und Konzentrationen der verschiedenen Hydrolyseprodukte für bestimmte pH-Werte und Chloridionen-Konzentrationen berechnen. Nach solchen Berechnungen sollte die Dichlorospezies im Plasma eindeutig dominieren, im Zytosol sollten daneben auch Mono- und Diaqua-Verbindungen sowie Hydroxo-Aqua-Komplexe und deren Oligomere in nennenswerten Konzentrationen existieren.

Die Bedeutung solcher Berechnungen erscheint allerdings insofern fragwürdig, als sie ein thermodynamisches Gleichgewicht voraussetzen, wie es unter physiologischen Bedingungen sicherlich nicht vorliegt [181]. Außerdem werden in diese Überlegungen die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten der Solvolyseprodukte nicht mit einbezogen. Gerade solche Unterschiede könnten aber bei der Selektivität der Wirkung und der Toxizität eines Cisplatin-Analogons eine entscheidende Rolle spielen [132].

Unter physiologischen bzw. Zellkultur-Bedingungen sind die Reaktionsmöglichkeiten von Platinkomplexen äußerst vielfältig und kompliziert, da aufgrund der komplexen Zusammensetzung des Kulturmediums wie auch der biologischen Flüssigkeiten eine Vielzahl potentieller Liganden für Substitutionsreaktionen zu Verfügung steht. Liganden wie Chlorid, Sulfat, Phosphat, Hydrogencarbonat, Citrat, Acetat, Oxalat, Ammoniak oder Hydroxylionen, die theoretisch alle mit Platinkomplexen reagieren können, sind entweder Komponenten von in-vitro- und in-vivo-Puffersystemen oder Bestandteile von Körperflüssigkeiten wie z. B. auch Zucker, Aminosäuren, Nukleotide, Porphyrine oder Vitamine wie Thiamin und andere Coenzyme [146, 147].

Obwohl auch H_2O ein potentieller Ligand ist und in der weitaus höchsten Konzentration (ca. 55 mol/l) vorliegt, ist das Wassermolekül aber gleichzeitig eine sehr gute Abgangsgruppe, so daß der Anteil an Hydrolyseprodukten durch das gleichzeitige Vorliegen relativ niedriger Konzentration an besseren Nukleophilen wie etwa Chlorid in Grenzen gehalten werden kann [146].

Ferner wird davon ausgegangen, daß weder Sulfat, Nitrat noch Phosphat an Platin koordinieren. Der Phosphat-Sauerstoff ist eine ähnlich gute Abgangsgruppe wie der Nitrat-Sauerstoff. Für Nitrat konnte gezeigt werden, daß es eine noch bessere Abgangsgruppe als Wasser und Acetat ist [146]. Die Ether-Sauerstoffatome der Zucker sind ebenfalls schlechte Elektronendonatoren und besitzen daher genau wie die alkoholischen Funktionen nur geringe Affinität zum Platin.

Im Gegensatz dazu sind Porphyrine, Thiamin [146], Nucleoside, Nukleotide [132, 146, 180-187] und v. a. die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein, Cystin, Methionin und das Tripeptid Glutathion [146, 147, 188] sehr gute Reaktionspartner. Mauldin et al. [189] haben die Austauschreaktionen von (d,l-trans-1,2-Diaminocyclohexan)malonatoplatin(II) in RPMI 1640-Medium, das 15% fetales Kälberserum enthielt, untersucht und festgestellt, daß Methionin, Cystein und Glutathion mit Platin 50-400-mal stabilere Addukte bilden, als die übrigen Aminosäuren. Die Adduktbildung mit S-Donatoren führt zum Verlust der Antitumorstoffwirkung [46, 47, 147, 189, 190].

2.2.2. Reaktionen mit Biopolymeren

Pt(II)-Komplexe binden an alle DNA- und RNA-Basen. Die Affinität der Nukleotide nimmt in der Reihenfolge $\text{GMP} > \text{AMP} > \text{CMP} > \text{TMP} = \text{UMP}$ ab [146, 185]. Bei physiologischen pH-Werten sind die Stickstoffatome N7 des Guanins bzw. N1 und N7 des Adenins die bevorzugten Angriffsorte [132, 146, 180-186]. Folgende Reaktionsprodukte von Cisplatin und DNA werden diskutiert:

(I) monofunktionelle Koordination von Platin an eine Nukleobase

(II) Verknüpfung zweier Basen in den beiden entgegengesetzten DNA-Strängen (Interstrand-Crosslink)

(III) Verknüpfung zweier Basen innerhalb eines DNA-Stranges (Intrastrand-Crosslink)

(IV) Vernetzung von DNA und Protein

(V) Bifunktionelle Koordination von Platin an eine DNA-Base (Chelatbildung)

Mit Ausnahme der Chelatbildung sind alle aufgeführten Varianten experimentell nachgewiesen worden [181, 185]. Aus in-vitro-Untersuchungen ergab sich, daß 1,2-Intrastrand-Crosslinks zwischen den N7-Positionen in d(GpG) (> 65% aller Koordinationsprodukte) und in d(ApG) (20-25%) die bevorzugten Addukte von Cisplatin und DNA sind, während die Quervernetzung weiter entfernter Basen und die Ausbildung von Interstrand-Crosslinks mit ca. 4% wesentlich seltener auftritt [185].

Röntgenstrukturdaten zeigen, daß H-Brücken zwischen dem 5'-Phosphat des Nukleotids bzw. dem O6 des Guanins und einem Ammin-Liganden des Cisplatins bei der Adduktbildung ebenfalls eine Rolle spielen [185]. Diese Wechselwirkungen scheinen für die Antitumoraktivität von Platinkomplexen mit primären und sekundären Amin-Liganden, welche in der beschriebenen Weise als Wasserstoffbrücken-Bildner fungieren, wichtig zu sein [161, 182, 185, 187].

Im Gegensatz zu den Nukleinsäuren, sind die Verhältnisse bei Proteinen wenig untersucht. Die Mindestzahl an potentiellen Bindungsstellen für Platin entspricht in jedem Protein der Anzahl der Peptidbindungen. Sowohl der N- als auch der C-Terminus - beide bei Neutral-pH geladen - können mit allen Platinkomplex-Ionen elektrostatische Wechselwirkungen eingehen. Carboxylate zeigen jedoch relativ geringe Bereitschaft für nukleophile Reaktionen und sind zusätzlich relativ gute Abgangsgruppen [146]. Im Gegensatz dazu ist die Affinität desamins zum Platin hoch. Diese Liganden sind zudem schlechte Abgangsgruppen, sofern sie keinem kinetischen trans-Effekt ausgesetzt sind. Daher ist der C-Terminus eines Proteins der bessere Reaktionspartner. Da die Konzentration der Peptidbindungen diejenige der individuellen Seitenketten deutlich übersteigt, und in jedem Protein, unabhängig von der Tertiärstruktur, zumindest immer einige der Amidbindungen zugänglich sind [191], müssen sie als Liganden in Betracht gezogen werden, insbesondere dann, wenn sie deprotoniert vorliegen.

Die höchste Affinität zum B-Typ-Metall Platin haben aber die Aminosäurereste des Cysteins und des Methionins. Die Nucleophilie des Schwefels nimmt in der Reihenfolge $RSH < RSR < RS^-$ zu, und die S-Pt-Bindung ist kinetisch inert [146]. Wie bereits erwähnt, ist die Nucleophilie des Stickstoffs in 1 Position des Imidazol-Rings im Histidin ebenfalls hoch. Außerdem ist Imidazol eine schlechte Abgangsgruppe. Verhältnismäßig hoch sind auch die Affinitäten von Arginin, Lysin und Tryptophan.

Mit anderen Worten: Platin(II) bindet an die schwefelhaltigen Aminosäurereste und den Imidazol-Ring des Histidins, sobald diese Gruppierungen im Protein zugänglich sind. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Bindung an Disulfidbrücken, sofern die Tertiärstruktur dies zuläßt. Die Reaktivität von Disulfiden mit Platin(II) ist vergleichbar mit derjenigen von Cystein und Methionin [146].

2.2.3. Freisetzung von Amin-Liganden

Obwohl nach den obigen Ausführungen und zahlreichen experimentellen Befunden davon ausgegangen werden muß, daß Amin-Liganden, insbesondere wenn sie zur Chelatbildung befähigt sind, in Injektionslösungen [138] und Kulturmedien [189] stabil an Platin gebunden bleiben [131, 132, 150], scheinen die Verhältnisse in Serum nicht so eindeutig zu sein.

So lieferten pharmakokinetische Untersuchungen von Platin(II)-Komplexen mit ^{195m}Pt bzw. ^{191}Pt als Zentralion und [^{14}C]-markiertem Ethylendiamin zunächst keinerlei Anhaltspunkte für eine Verdrängung des Amin-Liganden durch bessere Nukleophile in vivo [131, 192, 193]. Aus analogen Experimenten ergaben sich aber später doch Hinweise, daß es unter bestimmten Bedingungen zur Freisetzung des Ethylendiamins kommen kann [194].

Erst kürzlich wurde berichtet, daß auch bei [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-ethylendiamin]dichloroplatin(II) der Ligand, der - wie der Komplex [195, 198, 199] - östrogene Eigenschaften besitzt [156, 196], in serumhaltigem Kulturmedium in Gegenwart von Methionin und Glutathion freigesetzt wird [188]. Die dem Komplex zugeschriebene Antitumorwirkung bei hormonsensitiven Tumoren [156, 169, 196, 197], insbesondere aber das "Östrogenrezeptor-Processing" und die Induktion des Progesteron-Rezeptors [198] nach einem Zerfall des Komplexes in den Amin-Liganden und eine zytotoxische Platinspezies könnten Wirkungen dieser Zerfallsprodukte sein. Die Ursächlichkeit des intakten Komplexes für die Auslösung dieser Effekte betreffende quantitative und kinetische Überlegungen [199] bleiben aber so lange zweifelhaft, wie die Wiederfindungsrate bei der chromatographischen Auftrennung von Komplex und Ligand weniger als 60 % beträgt, und der radioaktiv markierte Komplex bereits den östrogenen [^3H]-Liganden als deutlich nachweisbare Verunreinigung enthält [199].

Im Gegensatz zu den obigen Befunden [188] ergaben zeitabhängige Untersuchungen der östrogenen Aktivität des entsprechenden Diaqua-Derivats mit Hilfe der Luziferase-Expression in MCF-7-Zellen keinen Hinweis auf einen solchen Zerfall [195], so daß zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Bedeutung dieses Phänomens noch nicht abschließend beurteilt werden kann.

3. Wirkmechanismus

Nach der allgemeinen Auffassung ist die DNA der entscheidende Angriffspunkt für Platin-Komplexe in der Zelle. V. a. Intrastrand-Crosslinks repräsentieren die kritischen Läsionen. Gründe für die zentrale Rolle der DNA bei der Antitumorwirkung finden sich z. B. in den Arbeiten von Pinto & Lippard [200] und Johnson et al. [180].

Daneben werden auch immer wieder sog. "alternative" Wirkmechanismen, wie etwa das Verursachen eines G₂-Arrests [201], bzw. das Auslösen von Apoptose (des vorprogrammierten Zelltods) [202] oder die Beeinträchtigung von Signalübertragungsprozessen an der Zellmembran durch Cisplatin ins Spiel gebracht. Da dies jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit ist, wird hier nur auf die Ausführungen von Koop [195] und Holler [203] und die dort zitierte Literatur verwiesen.

Die Art und Weise wie Cisplatin und seine Analogen in die Tumorzelle gelangen, sei es über einfache bzw. erleichterte Diffusion oder über einen aktiven Transportvorgang ist immer noch Gegenstand kontroverser Diskussionen [104, 121, 138, 171, 204-210]. Dies rührt nicht zuletzt daher, daß die Messung niedriger Platinkonzentrationen in biologischen Materialien mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS), die in den meisten Arbeiten zur Platinbestimmung eingesetzt wird, unter gewissen Bedingungen sehr störanfällig ist [121].

Die Problematik der Beurteilung von Literaturangaben zum Ausmaß der intrazellulären Anreicherung und zum Mechanismus der Aufnahme von Cisplatin zeigt das folgende Beispiel. Unlängst publizierten Just & Holler [207] eine 1600-fache Platinanreicherung in P388 D₁-Zellen, die in vitro 2 h mit 1 µmol/l Cisplatin behandelt worden waren. Ohne die Energetik der Anreicherung zu untersuchen, war den Autoren dieser Befund Hinweis genug, um die Aufnahme von Cisplatin in diese Mäuse-Leukämiezellen auf einen aktiven Transport zurückzuführen.

Im krassen Gegensatz zu einer derart extremen Platinakkumulation kam es im Wiederholungsexperiment nach Validierung der AAS-Methodik mit Hilfe der Neutronenaktivierungsanalyse [211] während der 2-stündigen Platinexposition gerade einmal zum Konzentrationsausgleich [121].

Oft ist es auch schwierig die Relevanz experimenteller Befunde, die aus meßtechnischen Gründen unter Verwendung extrem hoher Platinkonzentrationen gewonnen wurden [208], für die Verhältnisse unter klinischen Bedingungen zu erkennen.

Außerdem wird in einigen Untersuchungen zur Beteiligung eines energieabhängigen Transportmechanismus stillschweigend davon ausgegangen, daß der ATP-Gehalt in den Zellen durch bestimmte Stoffwechselgifte auch im Zellkulturmedium, das normalerweise ja reich an Glukose und anderen Nährstoffen ist, stark abgesenkt wird [209]. Da dies aber keineswegs immer der Fall ist [121], können leicht Fehlinterpretationen der Versuchsergebnisse provoziert werden.

4. Toxizität

Die klinische Anwendung von Cisplatin und Carboplatin wird durch eine Reihe schwerer Nebenwirkungen eingeschränkt [57, 131, 134, 136, 144, 148], deren Ausprägung und zeitliches Auftreten von der verabreichten Dosis und dem Behandlungsschema abhängen. Die Platinkomplexe nehmen unter den Antitumormitteln eine gewisse Sonderstellung ein, da sich ihr Toxizitätsprofil [138, 212] aus den wohlbekannten Nebenwirkungen typischer Alkylantien [213] und der Giftigkeit von Schwermetallen [214, 215] zusammensetzt. Die Toxizität von Platinkomplexen kann sich in Fehlfunktion der Nieren, durch Übelkeit und Erbrechen, periphere Neuropathien, Beeinträchtigung des Gehörs, Schädigung des Knochenmarks, Störungen des Sehvermögens, in seltenen Fällen auch durch Krämpfe und allergische Reaktionen äußern.

Beim Cisplatin stehen Nephrotoxizität, Neurotoxizität und Ototoxizität im Vordergrund und sind besonders besorgniserregend, da sie kumulativ und nach Absetzen der Therapie nur teilweise reversibel sind. Akutes Nierenversagen kann innerhalb von 24 Stunden nach der Verabreichung von Cisplatin eintreten, insbesondere dann, wenn die Patienten vor und während der Behandlung nicht ausreichend bewässert werden. Bei Gabe der üblichen Dosis von 100 mg pro m² Körperoberfläche und Zyklus hält sich die Fehlfunktion der Nieren dank einer intensiven Hydratationstherapie bei forcierter Diurese jedoch in Grenzen und ist i. d. R. reversibel.

Für das Ausmaß der Nierenschädigung ist nicht allein das Zentralion Platin verantwortlich, sondern es wird vermutlich sowohl durch die Art der Abgangsgruppe als auch durch den Neutralliganden bestimmt. Obwohl der dafür verantwortliche Mechanismus noch weitgehend unklar ist, sind hoch reaktive, geladene Aquaspezies bei vergleichbarer Antitumorstärke stärker nephrotoxisch, als die kinetisch relativ inerten neutralen Dichloro-, Carboxylato- und Malonato-Komplexe [138, 212, 216].

Übelkeit und Erbrechen sind gemeinsame, folgenschwere Nebenwirkungen von Zytostatika wie Doxorubicin, Dacarbazin, Stickstofflost, Cyclophosphamid (hochdosiert) und Cisplatin. Tatsächlich ist unter allen bekannten Arzneimitteln Cisplatin diejenige Substanz, die in dieser Hinsicht am stärksten wirkt. Trotz des kombinierten Einsatzes verschiedener Antiemetika ist bei manchen Patienten das Erbrechen immer noch so heftig, daß sie eine Fortsetzung der Cisplatin-Therapie aus diesem Grund ablehnen.

Ein großer Vorteil von Cisplatin besteht darin, daß seine Myelotoxizität, die bei den meisten Zytostatika die Dosis-limitierende Toxizität darstellt, vergleichsweise gering ist. Dies ist von besonderer Bedeutung für die Polychemotherapie, da Cisplatin sehr effektiv mit anderen Chemotherapeutika kombiniert werden kann, ohne daß das Knochenmark dadurch zusätzlich geschädigt wird.

Mit dem Carboplatin ist es gelungen einen Platinkomplex in der Klinik zu etablieren, dessen nephrotoxische und emetogene Wirkung im Vergleich zum Cisplatin deutlich geringer ausgeprägt ist [134, 136, 138, 212]. Neurotoxizität und Ototoxizität wurden durch die Einführung der Dicarboxylato-Abgangsgruppe im großen und ganzen nicht verändert.

Im Gegensatz dazu kam es aber zu einer drastischen Verstärkung der Myelosuppression, die somit zur Dosis-limitierenden Toxizität von Carboplatin wird. Aus diesem Grund und wegen seiner Wirkungslosigkeit bei Cisplatin-resistenten Tumoren gelangt man in letzter Zeit immer mehr zur Ansicht, daß Carboplatin keine Alternative zur "First-Line-Therapie" mit Cisplatin darstellt.

Ähnliches scheint, sofern dies aufgrund der bisherigen Ergebnisse von Phase-I- und II-Studien beurteilt werden kann, auch für Platin-DACH, Tetraplatin, Iproplatin und Spiroplatin, die alle wie Carboplatin Vertreter der Platinkomplexe der 2. Generation sind, zu gelten [134, 136, 212].

5. Cisplatin-Resistenz

Die antineoplastische Aktivität von Cisplatin wird außerdem sowohl durch primäre als auch durch sekundäre, d. h. erworbene Resistenz der Tumorzellen limitiert. Primärresistenz heißt, daß bestimmte Krebsarten wie etwa das Colonkarzinom, das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom, das Nierenzellkarzinom und das Maligne Melanom schon zu Beginn der Zytostatika-Therapie nicht auf diese Behandlung ansprechen.

Erworbene Resistenz tritt erst auf, nachdem der Primärtumor anfänglich eine Zeit lang auf eine bestimmte Therapie angesprochen hatte. Sie beruht entweder auf Veränderungen der Zellen unter dem Selektionsdruck der Chemotherapie oder auf dem Vorhandensein einiger bereits primär resistenter Zellen, welche den Therapieversuch überleben und zu einem Relaps führen [104, 217].

Es wurde eine Reihe von Mechanismen beschrieben, die zu einer Resistenz der Tumorzellen gegenüber Cisplatin führen können [46, 47, 139, 218, 219].

Beispielsweise ist bei vielen Cisplatin-resistenten Krebszelllinien die intrazelluläre Wirkstoff-Anreicherung infolge einer reduzierten Aufnahme verringert [160, 220]. Im Gegensatz zum Phänomen der Multi-Drug-Resistenz, bei dem Chemotherapeutika mit ganz unterschiedlichen Strukturen von einem gemeinsamen Carrier, dem P-Glycoprotein, verstärkt aus der Zelle heraustransportiert werden [45], spielt dieser Mechanismus bei der Cisplatin-Resistenz keine Rolle [220].

Ein erhöhter Spiegel an Metallothionein, einem intrazellulären Protein aus 61 Aminosäuren - 20 davon sind Cystein-Reste - und das zur Schwermetall-Entgiftung dient [215], kann zur vermehrten Inaktivierung von Cisplatin und damit zur Cisplatin-Resistenz führen [221]. Eine weitere Ursache für Resistenz besteht in einer Erhöhung des Glutathion-Spiegels. Cisplatin kann an Glutathion (GSH) gebunden und dadurch ebenfalls inaktiviert werden. Außerdem vermindert GSH an der DNA die Umwandlung von Cisplatin-Monoaddukten in die für die Wirkung notwendigen Intra- und Interstrand-Crosslinks [222].

Die effiziente Erkennung von Cisplatin-DNA-Crosslinks und die hohe Aktivität der beteiligten Reparatursysteme scheinen bei der Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin eine genauso wichtige Rolle zu spielen [223, 224].

Interessanter Weise kann auch GSH zur Erhöhung der DNA-Repairaktivität beitragen [225]. Außerdem wurde bei einigen Cisplatin-resistenten Zelllinien eine erhöhte Aktivität von Glutathion-S-Transferase, einem Enzym, das elektrophile Substanzen wie Cisplatin mit GSH konjugiert und dadurch inaktiviert, gefunden [226, 227].

Meist ist für die Resistenzentwicklung nicht nur ein einzelner Faktor verantwortlich, sondern sie beruht vielmehr auf einer Kombination von mehreren Mechanismen, die darüber hinaus von Tumor zu Tumor stark variieren können. Biochemische Prozesse, wie das Ausmaß der Substanzinaktivierung und die Effizienz des DNA-Repairs, scheinen sich jedoch im Tumorgewebe wie im gesunden Gewebe in gleichem Maße auszuwirken. Sie sind vermutlich nicht allein durch die Besonderheiten des Tumors, sondern auch durch die genetische Disposition des jeweiligen Patienten bestimmt. Untersuchungen von Pt-DNA-Addukten in Leukozyten aus peripherem Blut ergaben große Schwankungen hinsichtlich des Ausmaßes der DNA-Platinierung nach Cisplatin-Behandlung [138, 226, 229]. Dabei korrelierte das Ausmaß der DNA-Platinierung in den Leukozyten von Patienten mit Ovarial- und Hodenkarzinomen mit ihrem Ansprechen auf die Cisplatin-Therapie.

6. Platinkomplexe der 2. und 3. Generation

Bereits vor der Entdeckung der antineoplastischen Aktivität des Cisplatins wurden schon Metallkomplexe vorklinisch getestet. Zwischen 1955 und 1979 waren es allein am NCI etwa 12000 Substanzen. Mit den damals gebräuchlichen Screeningsystemen war die Chance, eine Substanz mit Antitumoraktivität zu finden, bei Metallkomplexen ungefähr 800 mal höher als bei organischen Verbindungen. Innerhalb dieses Zeitraums erfüllten am NCI etwa 1000 Metallverbindungen die Minimalanforderungen für Antitumoraktivität [132].

Gleich nach der Entdeckung der Antitumorwirkung des Cisplatins wurde verstärkt nach Substanzen gesucht, die sich einerseits durch eine bessere Wasserlöslichkeit auszeichnen, andererseits sollten sie aber auch weniger gravierende Nebenwirkungen besitzen [134, 136, 139]. Im Laufe der Zeit konzentrierte sich die Suche aber immer mehr darauf, wirksamere Komplexe zu finden, insbesondere solche, die auch bei Cisplatin-resistenten Tumoren aktiv sind.

Obwohl schon viele neue Platin-Komplexe klinisch geprüft worden sind, scheinen nur sehr wenige die gewünschten Kombinationen aus physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften zu besitzen, die nötig wären, um Cisplatin und Carboplatin überlegen zu sein.

Auf dem "6. Internationalen Symposium über Platin- und andere Metall-Komplexe in der Krebstherapie" im Januar 1991 wurde über acht neue Vertreter aus der 2. und 3. Generation von Platinkomplexen berichtet, von denen die Mehrzahl gegenüber der Cisplatin-resistenten L1210-Leukämie aktiv ist, und die sich alle zur Zeit in frühen Phasen der klinischen Prüfung befinden [139].

Die Verbindungen Ormaplatin (früher Tetraplatin) [230], Oxalatoplatin [231] und das in Form von Liposomen verabreichte NDDP [232] besitzen als gemeinsames Strukturmerkmal den 1,2-Diaminocyclohexan-Liganden. Enloplatin [139], Zeniplatin [233], NK121 und DWA2114R [234] haben 1,1'-Cyclobutandicarboxylat als Abgangsgruppe.

Je nach Struktur, ähneln diese neuen Cisplatin-Analoga hinsichtlich ihres Nebenwirkungsspektrums und der Art ihrer Dosis-limitierenden Toxizität entweder mehr dem Cisplatin oder dem Carboplatin. Überraschender Weise scheint aber bei Enlo- und Zeniplatin, die Nephrotoxizität, trotz der kinetisch inerten Abgangsgruppe, im Vordergrund zu stehen.

Bemerkenswert ist das geringe Proteinbindungsvermögen von Zeniplatin, DWA 2114R und NK 121. Besonders interessant erscheint in dieser Hinsicht die Verbindung 234 S, ein Cisplatin-Derivat mit einem Glycolato-Liganden. Nach 6 h liegt dieser Komplex im Serum noch vollständig in freier Form vor [234].

VII. Neue Diphenylethylendiaminplatin(II)-Komplexe

Im Arbeitskreis von Prof. Schönenberger wird seit beinahe 20 Jahren daran gearbeitet, die Selektivität von Krebs-Chemotherapeutika durch Kopplung einer zytotoxischen Gruppe an biologisch aktive Carriermoleküle zu erhöhen.

Im Falle des hormonsensitiven Mammakarzinoms erschienen die Verhältnisse besonders günstig, da sich natürliche Hormone wie etwa Östradiol oder synthetische nicht-steroidale Östrogene wie Diethylstilböstrol, die aufgrund ihrer hohen Affinität zum Östrogenrezeptor (ER) in den Tumorzellen angereichert werden und in hoher Dosierung schon per se eine gewisse Antitumorrwirkung besitzen [48], als Carrier anboten [235].

Ausgangspunkt für die geplanten Neuentwicklungen war das nicht-steroidale Östrogen Hexöstrol. Der Ersatz der beiden Ethylgruppen durch NH₂-Funktionen schaffte die Voraussetzungen zur stabilen Komplexierung mit Platin(II) [236].

Obwohl weder Cis- noch Carboplatin bei der Behandlung des metastasierten Brustkrebses eine Rolle spielen, gibt es neuerdings Hinweis darauf, daß Platinkomplexe, insbesondere wenn sie als "First-Line-Therapeutikum" eingesetzt werden, am Mammakarzinom doch wirksamer sein können, als ursprünglich angenommen [237].

Nicht zuletzt aus diesem Grunde erweist sich die Wahl von Cisplatin als zytotoxisches Wirkprinzip der neuen Diphenylethyldiamin-Derivate als vorteilhaft.

Voraussetzung für das Funktionieren des angestrebten "Drug-Targeting-Konzeps" [156] ist die Erhaltung der Rezeptoraffinität des neuen Wirkstoffs, auch nach Einführung der zytotoxischen Platin-Gruppierung. Außerdem darf die neue Verbindung nicht zu reaktiv sein, da die Reversibilität der Rezeptorbindung eine wesentliche Voraussetzung für den Transport der zytotoxisch aktiven Cisplatin-Gruppe zur DNA [236] ist.

Neben Platinkomplexen für die Therapie des Mammakarzinoms wird auch nach Cisplatin-Analoga mit breiterem Indikationsgebiet, wie z. B. Prostata-, aber auch Ovarialkarzinum, gesucht. Ovarialkarzinome können zwar mit Cisplatin anfänglich meist gut behandelt werden, in vielen Fällen tritt aber nach einiger Zeit ein Relaps auf [143]. Der neu entstandene Tumor ist dann fast immer Cis- und Carboplatin-resistent.

Dieser Zielsetzung folgend wurde eine Vielzahl diastereomerer (1,2-Diphenylethyldiamin)dichloroplatin(II)-Komplexe synthetisiert. Tatsächlich besitzen einige dieser neuen Cisplatin-Analoga, abhängig von der jeweiligen Struktur, an einem oder mehreren Nager-tumormodellen (P388- bzw. L1210-Mäuseleukämie, hormonsensitives und hormonunabhängiges MXT-Mammakarzinom der Maus, DMBA-induzierter Brustkrebs der Ratte, Dunning- und Noble-Prostatakarzinom der Ratte) in vivo bemerkenswerte Antitumoraktivität [238-243].

Auffallend waren diesbezüglich diastereomere ortho- [240, 241] und meta- [242] OH-substituierte Komplexe und dihalogenierte (1,2-Diphenylethyldiamin)dichloroplatin(II)-Derivate [33, 78].

Die Testergebnisse einer Reihe von 4-OH-Verbindungen [155] mit variablen ortho-Substituenten [243] führte zur Synthese diastereomerer [1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethyldiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe [169, 196]. Hinweise auf die besondere Bedeutung von Fluor in 4-Stellung ergab die Prüfung verschiedener para-substituierter Verbindungen [239].

Da diese Komplexe alle sehr schlecht wasserlöslich sind, wurde durch die Einführung von Sulfat oder Nitrat versucht, ihre Löslichkeit zu verbessern [166, 169]. Die Wasserlöslichkeit dieser Derivate ist aber immer noch so gering, daß sie für die in-vitro-Testung trotzdem in organischen Solventien, wie etwa DMF gelöst werden müssen [104].

Mit Ausnahme von [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]platin(II) [169] sind die R,R/S,S-konfigurierten Komplexe i. a. wirksamer als die entsprechenden meso-Verbindungen [238]. Die Trennung der 3-OH- [241] und 4F-substituierten [99] Komplexe in die reinen Enantiomeren erhöht die Antitumoraktivität dieser Cisplatin-Analoga nicht.

Aufgrund der bisher vorliegenden vorklinischen Daten zeichnen sich innerhalb der Verbindungsklasse der (1,2-Diphenylethylendiamin)platin(II)-Komplexe drei Entwicklungsrichtungen ab:

(I) Verbindungen mit östrogenen Wirkung (z. B. [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]platin(II)) zur Behandlung hormonsensitiver Tumoren [78, 156, 169, 196], insbesondere des Prostatakarzinoms [197, 244]

(II) Komplexe mit OH-Gruppen in ortho- [65, 67, 101, 103, 245] oder meta- [65, 66] Stellung zur Therapie des Ovarialkarzinoms (z. B. racem-[1,2-Bis(2-hydroxyphenyl)ethylendiamin]platin(II))

(III) Fluor-substituierte Derivate (z. B. racem-[1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)) [166, 167, 170] v. a. zur Behandlung des hormonsensitiven und des hormonunabhängigen Mammakarzinoms [63, 99, 102, 104]

1. [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe

Die am besten untersuchten Vertreter der sog. "östrogenen Platinkomplexe" sind [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II) und dessen Diaquaderivat.

1.1. Rezeptorbindungsaffinität und östrogene Eigenschaften

Obwohl ihre Affinitäten zum Östrogenrezeptor (ER) mit < 1% sehr niedrig sind [63, 196, 198], besitzen diese Substanzen im Dorfman-Test eindeutig östrogene Eigenschaften [78, 156, 196]. Untersuchungen mit Radioliganden erbrachten indirekte Hinweise auf das Auslösen des "ER-Processings" und die Induktion des Progesteronrezeptors (PR) durch diese Verbindungen [198, 199]. Darüber hinaus wurde beim Dichloro-Derivat ER-abhängige Expression von CAT- und Luciferaseaktivität nachgewiesen [195].

1.2. Antitumorwirkung in vitro

In pharmakologisch relevanten Konzentrationen sind diese Komplexe gegenüber hormonunabhängigen (MXT (M3.2-OVEX) [246] MDA-MB-231 [63]), aber auch hormonsensitiven murinen (MXT (M3.2)) [246] und menschlichen (MCF-7, T-47-D, ZR-75-1) [63, 104, 199] Mammakarzinommodellen in vitro wirkungslos.

1.3. Antitumorwirkung an hormonsensitiven Nagertumoren in vivo

In krassem Gegensatz dazu ist in vivo sowohl [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II) als auch sein Diaqua-Derivat gegenüber hormonsensitiven Nagertumoren (MXT (M 3.2) Mammakarzinom der B6D2F₁ Maus, DMBA-induziertes Mammakarzinom der SD-Ratte [156, 169, 196], Dunning-R-3327- und Noble-Prostatakarzinom der Ratte [197, 244]) hochaktiv, während die hormonunabhängige Variante des MXT-Tumors und P388 in ihrem Wachstum nicht gehemmt werden [78, 156, 196].

1.4. Wirkungen nach peroraler Applikation

Die östrogenen Eigenschaften und die selektive Wachstumshemmung der hormonsensitiven MXT-Variante bleiben auch nach peroraler Gabe von [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II) erhalten [244].

Die Tatsache, daß Cisplatin und Carboplatin ebenfalls aus dem Dünndarm der Ratte per Diffusion resorbiert werden [247], ermutigt zur Weiterentwicklung von wenig toxischen, p. o. applizierbaren, östrogenen Platinkomplexen [78, 244], insbesondere für die Therapie des hormonsensitiven Prostatakarzinoms [197, 244].

1.5. Antitumorwirkung an menschlichen Brustkrebsmodellen in der Nacktmaus

In der Nacktmaus war [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]platin(II) sowohl am hormonunabhängigen MDA-MB-231-Tumor als auch an den hormonsensitiven MCF-7- und ZR-75-1-Mammakarzinomen unwirksam [70]. Erwähnung verdient hier die Beobachtung, daß auch hormonsensitive Nagertumoren (MXT-Mammakarzinom, Dunning-Prostatakarzinom) nach Implantation in die Nacktmaus nicht mehr auf die Substanz ansprechen [248]. Somit könnte bei dieser speziellen Verbindung das Nichtansprechen der menschlichen Tumoren eventuell durch das "Testsystem Nacktmaus" bedingt sein und muß nicht unbedingt eine Eigenschaft der Tumoren selbst sein.

1.6. Vorstellungen zum Wirkmechanismus

Die Aufklärung des Wirkmechanismus von [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)-ethylendiamin]platin(II) ist Gegenstand einer laufenden Dissertation [246]. Die bisher gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß:

(I) die Tumorremission nicht auf eine direkte zytotoxische Wirkung an der Tumorzelle zurückzuführen ist, da die Substanz in pharmakologisch relevanten Konzentrationen gegen hormonsensitive MXT-Zellen in vitro unwirksam ist [246]

(II) bei der Tumorremission das Immunsystem involviert ist, da hormonsensitive Nagertumoren in thymusaplastischen Mäusen auf diese Substanz nicht mehr ansprechen [248]

(III) die Tumorremission - zumindest teilweise - auf die östrogene Wirkung dieser Substanz [156, 196] zurückzuführen ist, da - ähnlich wie bei DES [249] an ovariectomierten Mäusen ein biphasischer Effekt beobachtet wird [246]

Auf die Untersuchungen zur Korrelation der Raumstruktur verschiedener Diphenylethylen-diaminplatin(II)-Komplexe mit den beobachteten östrogenen bzw. antiöstrogenen Wirkungen [250] einzugehen, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

2. [1,2-Bis(2-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II) und [(Hydroxyphenyl)-2-phenylethyldiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe

Im Hinblick auf die neue Indikation Ovarialkarzinom wurden vier stereoisomere [1,2-Bis(2-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Verbindungen (meso-di-2-OH, racem-di-2-OH, getrennte Enantiomere) und fünf isomere [(Hydroxyphenyl)-2-phenylethyldiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe (threo-2-OH, erythro- 3-OH, threo-3-OH, erythro-4-OH und threo-4OH) an den menschlichen Ovarialkarzinomzelllinien SK-OV-3 und NIH-OVCAR-3 hinsichtlich ihrer Antitumorwirkung mit Cisplatin verglichen [65-67, 101, 103, 245].

2.1. In vitro Chemosensitivitätstests an menschlichen Ovarialkarzinom-Zelllinien

2.1.1. Langzeitexposition von SK-OV-3- und NIH-OVCAR-3-Zellen

SK-OV-3: Alle Platinkomplexe wurden im vorher beschriebenen kinetischen Chemosensitivitätstest [34] in einer Endkonzentration von 1 μM , 2,5 μM und 5 μM eingesetzt und verblieben während der gesamten Versuchsdauer (162 h) im Kulturmedium.

Lediglich Cisplatin wirkte in der höchsten Konzentration zytozid. In äquimolarer Dosierung war bei (-)-di-2-OH und threo-3-OH eine vergleichsweise schwache Hemmung der Zellproliferation mit T/C-Werten um 65 zu beobachten. Alle übrigen Verbindungen zeigten keinerlei Wirkung [65].

NIH-OVCAR-3: Das Experiment wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Versuchsdauer betrug jedoch 256 h. Diese Zelllinie reagierte auf alle getesteten Pt-Komplexe deutlich empfindlicher als SK-OV-3; es besteht eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung. Cisplatin zeigt in der 1 μM Konzentration zytozide Wirkung. Die di-OH-substituierten Pt-Derivate sind wirksamer als die monohydroxylierten (aktivster Vertreter dieser Reihe ist threo-3-OH). Im Vergleich mit Cisplatin werden bei den Dihydroxy-Komplexen höhere Dosierungen benötigt, um die gleiche Wirkung hervorzurufen. Die äquiaktiven, zytoziden Konzentrationen sind für meso-di-2-OH 5 μM bzw. 2,5 μM für racem-di-2-OH sowie für die getrennten optischen Antipoden.

2.1.2. Stabilität der Komplexe im Kulturmedium

Cisplatin, racem-di-2OH und beide Enantiomeren wurden in RPMI 1640 mit 10% FCS und Insulin bei 37° C unterschiedlich lange (0-75 h) vorinkubiert. Die Bestimmung der Substanzstabilitäten erfolgte indirekt im Chemosensitivitätstest mit NIH-OVCAR-3-Zellen.

Alle Pt-Komplexe werden unter Zellkulturbedingungen schnell inaktiviert. Cisplatin zeichnet sich durch die höchste Stabilität [63, 65, 84, 102, 104] aus, gefolgt vom linksdrehenden Enantiomer, welches nach 3 h Vorinkubation noch unverminderte pharmakologische Aktivität aufweist [103].

2.1.3. Bestimmung der effektiven Einwirkzeit an NIH-OVCAR-3-Zellen

In den Konzentrationen 2,5 und 5 $\mu\text{mol/l}$ zeigte keiner der 10 getesteten Pt-Komplexe im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen nach einer Einwirkzeit von einer Stunde eine therapeutisch verwertbare Hemmung der Zellproliferation.

Abhängig von der eingesetzten Konzentration müssen die Tumorzellen zwischen 3 und 6 h mit den jeweiligen Substanzen in Kontakt sein, um abgetötet zu werden [65, 66, 101, 103].

2.2. Wirkung von (-)-[1,2-Bis(2-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II) am NIH-OVCAR-3-Tumor in der Nacktmaus

Diese Verbindung erwies sich im Nacktmausmodell am subkutan wachsenden NIH-OVCAR-3 Tumor [126] in der maximal tolerierten Dosierung von 10 μmol pro kg Körpergewicht bei i. p. Applikation (dreimal wöchentlich) als unwirksam [65, 70].

3. [1,2-Bis(fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Verbindungen

An der murinen Leukämie P388 zeigen die stereoisomeren [1,2-Bis(fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe ebenfalls hohe antineoplastische Aktivität in vivo [170, 251]. In vitro besitzen die diastereomeren [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe an der P388 D₁-Zelllinie mit Cisplatin vergleichbare Wirkung.

Das Racemat verursacht den halb-maximalen Effekt, jedoch viel schneller als die entsprechende meso-konfigurierte Verbindung und Cisplatin. Da das Racemat durch einen kurzen Kontakt mit den Zellen den ³H-Thymidin-Einbau in ähnlichem Ausmaß hemmt wie durch eine 48-stündige Dauerinkubation, wurde eine schnelle Aufnahme des Racemates in die Zellen vermutet [167].

Durch die Überführung der [1,2-Bis(fluorphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe in die Diaqua-Derivate wurde, wie schon erwähnt, versucht, die geringe Wasserlöslichkeit der Dichloro-Komplexe zu erhöhen [166].

Die diastereomeren Diaqua[1,2-bis(fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe [166] bewirken eine starke Hemmung des MXT (M 3.2) Mammakarzinom der B6D2F₁ Maus. Im Gegensatz zu den Racematen sind die meso-konfigurierten Verbindungen auch gegen das hormonunabhängige MXT (M 3.2)-OVEX Mammakarzinom der B6D2F₁ Maus aktiv [217].

Substanzen, die sowohl an ER-positiven als auch an ER-negativen Mammakarzinomen wirken, können von großem therapeutischen Wert sein, denn sie sollten die Resistenzentwicklung, welche bei einer Hormontherapie durch die Proliferation hormonunabhängiger Tumorzellklone entsteht, verzögern oder sogar verhindern können [104, 217].

Außerdem ist das Racemat an einer Sublinie der L1210-Leukämie der Maus, die 100-fach resistent gegen Cisplatin ist, hoch aktiv [167, 251].

3.1. Wirkung am Ovarialkarzinom

An beiden Ovarialkarzinomzelllinien waren alle untersuchten (1,2-Diphenylethylendiamin)-platin(II)-Komplexe schlechter wirksam als Cisplatin [63]. An der SK-OV-3-Linie sind die untersuchten Pt-Komplexe nur wenig aktiv.

3.2. Struktur-Wirkungsbeziehungen am menschlichen Mammakarzinom

Mit dem entwickelten Chemosensitivitätstest [34] wurde die Wirkung der diastereomeren 2-, 3- und 4-Fluor-substituierten Dichloro- und Diaqua-Komplexe an 4 Zelllinien untersucht [63].

Die Cisplatin-Analoga wurden in drei verschiedenen Konzentrationen im Dauerinkubationsversuch eingesetzt. Dabei waren zwischen den Zelllinien die gleichen Sensitivitätsabstufungen zu beobachten wie im Falle etablierter Chemotherapeutika [34, 63]. Bei den Mammakarzinomzelllinien waren die Unterschiede zwischen T-47-D, ZR-75-1 und MCF-7 nicht sehr ausgeprägt, die MDA-MB-231 Linie reagierte aber deutlich weniger empfindlich.

Die Komplexe mit Fluor in para-Stellung waren i. d. R. an allen untersuchten Zelllinien stärker wirksam als die 2F- und 3F- substituierten Komplexe.

Mit Ausnahme der ZR-75-1 Linie waren die racemischen [1,2-Bis(fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe den entsprechenden meso-konfigurierten Verbindungen bezüglich ihrer proliferationshemmenden Wirkung meist überlegen.

Bei der Variation der Abgangsgruppen, bzw. der Gegenionen waren die Dichloro-Komplexe wirksamer (an MCF-7, T-47-D und MDA-MB-231) oder zumindest gleich wirksam (an ZR-75-1) wie die entsprechenden Diaqua-Komplexen. Die Diaqua[1,2-bis(2-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II) Sulfate sind jedoch eine Ausnahme, da sie in manchen Fällen besser wirkten als die analogen Dichloro-Komplexe [63].

Durch die Enantiomerentrennung von [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin-(II) konnte keine Wirkungssteigerung erzielt werden [99].

Die 4F-substituierten Komplexe waren Cisplatin an allen Mammakarzinomzelllinien überlegen [63].

3.3. [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe

3.3.1. Inaktivierung im Kulturmedium

Mit den para-Fluor-substituierten Komplexen wurden detaillierte Untersuchungen über die Substanzinaktivierung im Kulturmedium, die effektive Einwirkzeit und die Anreicherung der Komplexe in den Zellen durchgeführt [63, 102, 104, 121].

Die Diaqua-Komplexe reagierten schneller mit Bestandteilen des Kulturmediums ab als die analogen Dichloro-Komplexe. Das Racemat und die meso-konfigurierte Verbindung wurden mit gleicher Geschwindigkeit inaktiviert. Die diastereomeren Dichloro-Komplexe waren, genau wie Cisplatin, nach einer 6-stündigen Inkubation im Kulturmedium noch vollständig aktiv [102, 104].

3.3.2. Ermittlung der effektiven Einwirkzeit an der menschlichen MCF-7-Brustkrebszelllinie

Durch Kurzzeitexposition der Tumorzellen mit Wirkstoff konnte nachgewiesen werden, daß die 4F-substituierten Racemate am MCF-7-Mammakarzinom die Hemmung der Zellproliferation bereits nach kürzeren Einwirkzeiten verursachen als die entsprechenden meso-konfigurierten Komplexe und Cisplatin [102, 104].

Während im Fall der schnell wirkenden Racemate zwischen dem Diaqua- und dem Dichloro-Komplex bezüglich des Wirkungseintrittes kein Unterschied zu beobachten war, benötigte bei den meso-konfigurierten Verbindungen der Diaqua-Komplex, der durch Bestandteile des Kulturmediums schnell inaktiviert wurde, einen wesentlich längeren Kontakt, um die maximale Hemmung zu bewirken.

3.3.4. Antitumorwirkung im Nacktmausmodell

Im krassen Gegensatz zu den in-vitro-Ergebnissen waren die [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe und Cisplatin an den menschlichen Mammakarzinom- (ZR-75-1 und MCF-7 [125]) und Ovarialkarzinom-Modellen (SK-OV-3 und NIH-OVCAR-3 [126]) in der thymusaplastischen NMRI (nu/nu) Maus inaktiv [63, 70, 102, 104].

4. Plasmaspiegel nach einmaliger i. p. Applikation

Zur Aufklärung der Diskrepanzen zwischen der antineoplastischen Wirkung der [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe in vitro und in vivo wurde die Pharmakokinetik von r-4F-PtSO₄, m-4F-PtSO₄, m-2,6Cl₂-4-OH-PtSO₄ und Cisplatin in der NMRI (nu/nu) Maus über einen Zeitraum von 72 h ermittelt. Außerdem wurde die Plasmaproteinbindung der Platinkomplexe durch Ultrafiltration unter Verwendung von Centricon Mikrokonzentratoren mit einer Ausschlußgröße von 10000 Dalton bestimmt [63, 102, 121].

Nach einer einzelnen intraperitonealen Applikation von 10 µmol Platinkomplex pro kg Körpergewicht werden maximale Plasmakonzentrationen von etwa 14-22 µmol/l erreicht [63, 121]. Im Falle von Cisplatin treten die höchsten Plasmakonzentrationen (18 µmol/l) bereits 15 min nach der Applikation auf und fällt dann relativ schnell wieder ab [63, 121, 138]. Für r-4F-PtSO₄, m-4F-PtSO₄ und m-2,6Cl₂-4-OH-PtSO₄ werden die maximalen Plasmakonzentrationen erst nach 4 bis 8 h beobachtet.

Der Hauptanteil der Platinkomplexe ist aber an Plasmaproteine gebunden und dadurch inaktiviert. Im Fall der diastereomeren Diaqua[1,2-bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Sulfate ergab die Platinbestimmung mittels NAA und AAS, daß in kurzer Zeit etwa 98% des Platins proteingebunden vorliegen [63, 102, 121]. Beim Cisplatin sind das unter den selben Bedingungen 94%.

Die Konzentrationen an freiem Wirkstoff, die in vitro für die zytotoxische, bzw. zytostatische Wirkung an menschlichen Tumormodellen notwendig sind (zwischen 1 und 5 µmol/l), werden nach Applikation der maximal tolerierten Dosis in vivo nicht erreicht.

Bei den Dichloro-Komplexen sind die Verhältnisse i. a. noch ungünstiger, da diese Verbindungen aufgrund ihrer geringeren Wasserlöslichkeit wesentlich schlechter resorbiert werden [121].

5. Entwicklung einer wasserlöslichen Arzneiform

Im Gegensatz zu den etwas besser wasserlöslichen, aber toxischen Nitrat- und Sulfat-Derivaten (D-17446-NO₃ bzw. D-17446-SO₄) war der racemische [1,2-bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplex (D-17446 [102]), der in Suspension eingesetzt werden mußte, auch am murinen MXT-Mammakarzinom in vivo unwirksam [217].

Unter Verwendung des Hilfsstoffs Pluronic F68 alleine oder in Kombination mit Harnstoff, gelang die Herstellung eines parenteral verabreichbaren fein dispersen Hydrosols (Partikeldurchmesser ca. 0,2 µm) mit einer maximalen Wirkstoffkonzentration von 25 mg/ml [252].

Die Wirkungsprüfung am hormonsensitiven MXT-Brustkrebsmodell ergab jetzt eine Dosisabhängige Hemmung des Tumorwachstums durch beide Formulierungen [70, 252].

Ein weiterer Vorteil der Hydrosole liegt in ihrer guten Verträglichkeit [69, 70, 252]. Aufgrund dessen kann die Dosis gesteigert und die Antitumorwirkung evtl. noch weiter verbessert werden.

6. Bindung an Serumalbumin

Viele Wirkstoffe werden, nachdem sie in den Kreislauf gelangt sind, von Erythrozyten und makromolekularen Bestandteilen des Blutes gebunden und sind in dieser Form biologisch inaktiv [253]. Einerseits können kationische Verbindungen mit den negativen Oberflächenladungen der roten Blutkörperchen wechselwirken, andererseits können lipophile Substanzen die Zellmembran durchdringen und wie z. B. im Fall von Serotonin durch Bindung an Hämoglobin intrazellulär angereichert werden [253].

Daß auch Platinkomplexe durch die Zytoplasmamembran ins Innere von Erythrozyten gelangen, wurde sowohl für Cisplatin als auch für verschiedene Diphenylethylendiaminplatin(II)-Derivate gezeigt [121, 171].

Die meisten Pharmaka werden im Plasma in mehr oder weniger starkem Ausmaß reversibel an Proteine, d. h. insbesondere an Albumin, gebunden [253-255]. Dafür sind neben ionischen v. a. hydrophobe Wechselwirkungen verantwortlich [253]. Im therapeutischen Konzentrationsbereich ist für die Mehrzahl der Wirkstoffe der gebundene Anteil, der mit dem freien Anteil im Gleichgewicht steht, konstant und wird in der Praxis prozentual angegeben.

Zur Bedeutung der Proteinbindung für die Pharmakokinetik und Wirkung eines Arzneistoffs sei auf die entsprechende Literatur verwiesen [253-255].

Es ist schon länger bekannt, daß Cisplatin an Albumin bindet [146, 147, 256]. Ausgehend von der Vorstellung, daß wie bei den meisten Pharmaka beim Absinken des freien Wirkstoffspiegels auch Platin-Komplexe aus der Proteinbindung freigesetzt werden, wurde sogar versucht, an Albumin gebundenes Cisplatin als Depotform therapeutisch einzusetzen [257].

Die Freisetzung von an Serumalbumin gebundenen Kationen durch Platin-Aqua-Spezies, deutet darauf hin, daß an der Bindung auch ionische Wechselwirkungen beteiligt sind [258]. Die Verdrängung des Magnesiums aus der Proteinbindung ist besonders kritisch, da es für diesen Mineralstoff außer Serumalbumin kein anderes Reservoir gibt und die freien Ionen schnell ausgeschieden werden. Darum muß bei Patienten, die mit Cisplatin behandelt werden, nicht nur der Magnesiumgehalt im Serum ständig kontrolliert, sondern auch der Verlust durch eine entsprechende Diät, z. B. Nüsse und Hülsenfrüchte, ausgeglichen werden [259].

Im Gegensatz zu den meisten Pharmaka ist die Bindung von Cisplatin-Analoga an Serumalbumin nur relativ kurze Zeit reversibel, da das Platin, in Abhängigkeit von der Art der Abgangsgruppe, früher oder später mit nukleophilen Zentren des Proteins irreversibel reagiert [146, 147, 256]. Dies wurde auch für verschieden substituierte Diphenylethylendiaminplatin(II)-Komplexe mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse [253] direkt nachgewiesen [121].

Zur Untersuchung der Geschwindigkeit der Bindung wurden Serumalbuminlösungen mit einer Proteinkonzentration von 3,4 und 34 mg/ml verwendet [102, 121]. Interessanterweise sind Geschwindigkeit und Ausmaß der Bindung abhängig von der Proteinkonzentration, obwohl Serumalbumin in beiden Fällen im Überschuß vorliegt.

Ein Vergleich der mit diesem Modellsystem gewonnenen Daten mit Ergebnissen von Messungen, die unter Zellkultur- bzw. in-vivo-Bedingungen durchgeführt worden sind, ergab mit Ausnahme von Cisplatin eine gute Übereinstimmung. Beim Cisplatin war das Ausmaß der Proteinbindung in vivo größer als im Modellexperiment [121]. Aus diesem Befund kann geschlossen werden, daß Cisplatin in vivo nicht nur an Serumalbumin, sondern auch an andere Plasmaproteine gebunden wird. Aufgrund ihrer höheren Lipophilie werden die Diphenylethylendiaminplatin(II)-Komplexe zunächst aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bevorzugt an Serumalbumin gebunden.

Mit Ausnahme von [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]platin(II), das ungewöhnlich schnell gebunden wird, haben weder Art noch Konfiguration des Diaminliganden einen merklichen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Bindung [121].

Im Gegensatz dazu besteht aber eine eindeutige Abhängigkeit von der Art der Abgangsgruppe [102, 121]. Die Geschwindigkeit der Bindung nimmt in der Reihenfolge Cyclobutandicarboxylat $< < \text{Cl}^- = \text{Br}^- < \text{SO}_4^- < < \text{I}^-$ zu. Die Hydrosol von D-17446 unterscheiden sich hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens an Serumalbumin vom analogen Dichloroderivat D-17446 nicht.

Geht man von der Vorstellung aus, daß eine Erhöhung der Konzentration an freiem Komplex, welche mit der Konzentration am Wirkort im Gleichgewicht steht, zu einer Wirkungsverstärkung führt, dann wird die Bedeutung von Cisplatin-Analogen, die relativ schlecht an Proteine gebunden werden, sofort klar. Angenommen, ein Platinkomplex wie etwa D-17446, der im Plasma vorübergehend eine Gleichgewichtskonzentration von $20 \mu\text{mol/l}$ erreicht, läge zu 98 % an Protein gebunden vor. Die freie Konzentration würde dann $0,4 \mu\text{mol/l}$ betragen. Wenn durch Einführung der Cyclobutandicarboxylato-Abgangsgruppe der an Protein gebundene Anteil auf 70% abnimmt, hätte das eine 15-fache Erhöhung der Konzentration an freiem D-17446-Carb zur Folge. Vorausgesetzt, daß dadurch weder Absorption noch Elimination verändert werden [255], läge der freie Plasmaspiegel dann mit $6 \mu\text{mol/l}$ im zytoxischen Konzentrationsbereich.

7. Aufnahme in Tumorzellen

Die Frage, ob 1,2-Diphenylethylendiaminplatin(II)-Komplexe, gemäß dem ursprünglich formulierten "Drug-Targeting-Konzept" [156, 235] in verschiedenen menschlichen Brustkrebs- (MCF-7, MDA-MB-231) und Ovarialkarzinomzellen (NIH-OVCAR-3- und SK-OV-3) angereichert werden, wurde mit Hilfe der Neutronenaktivierungsanalyse und der Atomabsorptionsspektroskopie beantwortet [63, 102, 104, 121, 171].

Tatsächlich wurde für einige Diphenylethylendiaminplatin(II)-Derivate im Gegensatz zu Cis- und Carboplatin in diesen Tumorzellen eine starke (maximal 70-fache) Anreicherung nachgewiesen [121]. Da ausschließlich solche Cisplatin-Analoga bevorzugt aufgenommen werden, die weder ER-Affinität noch hormonelle Eigenschaften besitzen, ist es unwahrscheinlich, daß die intrazelluläre Akkumulation vom Östrogenrezeptor vermittelt wird.

7.1. Beziehungen zwischen Struktur, Anreicherung und Antitumorwirkung

Aufnahmegeschwindigkeit und Ausmaß der intrazellulären Pt-Anreicherung variieren abhängig vom jeweiligen Neutralliganden und der Abgangsgruppe sehr stark [63, 102, 104, 121, 171].

Sie werden bestimmt durch:

(I) die Art, Position und Anzahl der Ringsubstituenten sowie die Konfiguration des 1,2-Diphenylethyldiamin-Liganden. Komplexe mit einer OH-Gruppe im Phenylring werden schlechter aufgenommen als monofluorierte Verbindungen. Die Cisplatin-Analoga mit Fluor in para-Stellung werden stärker akkumuliert als ihre ortho-Isomeren [121]. Die Einführung weiterer Ringsubstituenten, gleichgültig ob OH oder Halogen, führt, mit Ausnahme des 2,6-Difluorderivats, zu einer deutlichen Verschlechterung der intrazellulären Anreicherung [121]. Racemische Komplexe werden im Vergleich zu den entsprechenden meso-konfigurierten Diastereomeren bevorzugt aufgenommen [63, 102, 104, 121].

(II) die Beschaffenheit der Abgangsgruppe. Die Aufnahme steigt bei konstantem [meso-1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethyldiamin]-Liganden in der Reihenfolge $I^- < \text{Cyclobutandicarboxylat} < Br^- = SO_4^{2-} = Cl^-$ an [121].

Interessanterweise ist, im Gegensatz zu Carboplatin [77, 260], D-17446-Carb (in DMF gelöst) im Chemosensitivitätstest hochwirksam [121], obwohl die intrazelluläre Akkumulation dieser Verbindung im Vergleich zu den entsprechenden Dichloro- und Diaqua-Derivaten geringer ist [121]. Gegenüber Cisplatin und Carboplatin wird aber D-17446-Carb beispielsweise von MCF-7-Zellen immer noch etwa 5-fach angereichert.

Das Aufnahmeverhalten der Hydrosole unterscheidet sich nicht von dem des entsprechenden Dichloroderivats D-17446.

Abgesehen von wenigen Ausnahmen (insbesondere Cisplatin) korreliert die Antitumoraktivität der untersuchten Cisplatin-Analoga mit ihrer intrazellulären Anreicherung [121]. Die Sensitivität der Tumorzelllinien nimmt in der Reihenfolge $MCF-7 > MDA-MB-231 > NIH-OVCAR-3 > SK-OV-3$ ab.

Während die intrazelluläre Platin-Konzentration für Cisplatin, Carboplatin und D-17446-Carb linear mit der Inkubationszeit ansteigt, erreicht die intrazelluläre Anreicherung der meisten (1,2-Diphenylethylendiamin)platin(II)-Komplexe einen Plateauwert [104, 121].

Carriersysteme sind u. a. dadurch gekennzeichnet, daß sie meist in der Lage sind, zwischen diastereomeren oder sogar enantiomeren Molekülen zu unterscheiden [261]. Das unterschiedliche Aufnahmeverhalten der physikochemisch sehr ähnlichen diastereomeren 4-F-substituierten Verbindungen deutet daher darauf hin, daß diese Komplexe überwiegend durch ein solches spezifisches Transportsystem in die Zellen aufgenommen werden [63, 102, 104, 121, 171].

Einen zusätzlichen Hinweis auf die Beteiligung eines Carriers liefern Untersuchungen zur Aufnahme von D-17446-SO₄ in Salzlösungen, die Sulfat als einziges Anion enthalten. Es wurde festgestellt, daß sich die Aufnahme dieses Komplexes unter diesen Bedingungen nicht von derjenigen in kompliziert zusammengesetzten Zellkulturmedien unterscheidet. Da davon ausgegangen werden muß, daß dieser Komplex in solchen Lösungen als Kation vorliegt und geladene Verbindungen nur in sehr beschränktem Maße in der Lage sind, durch die Zytoplasmamembran zu diffundieren, ist die Beteiligung von Carriermolekülen wahrscheinlich.

Wäre die Aufnahme dieser Cisplatin-Analoga auf passive Diffusion zurückzuführen, dann müßte die Anreicherung mit steigender Lipophilie der Komplexe zunehmen [261]. Der Befund, daß eine Erhöhung der Lipophilie durch Einführung hydrophober Ringsubstituenten oder Abgangsgruppen zu einer deutlichen Verringerung der Anreicherung führt, stützt ebenfalls die Annahme, daß die Diffusion - im Gegensatz zu Cis- und Carboplatin - für die Akkumulation der [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe eine untergeordnete Rolle spielt [121].

7.2. Untersuchungen zur Charakterisierung des Transportsystems

Der direkte Beweis für die Beteiligung eines Carriers kann jedoch aufgrund der sehr geringen Wasserlöslichkeit der [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe mit den üblichen Methoden, d. h. einer Absättigung der Transportkapazität, nicht geführt werden [121].

Es wurde aber ausgeschlossen, daß es sich bei der beobachteten Akkumulation um einen primären aktiven Transport [262] handelt, da die Platinaufnahme durch eine Absenkung des intrazellulären ATP-Spiegels nicht beeinflußt wird [121].

Im Gegensatz dazu wird sowohl durch Quabain als auch durch eine Absenkung der extrazellulären Na^+ -Konzentration die Aufnahme in die Zellen erniedrigt. Diese Effekte sind jedoch nicht groß genug, um die gesamte Anreicherung der racemischen [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe auf ein sog. sekundäres aktives Transportsystem [262] zurückzuführen.

Vielmehr scheinen für die intrazelluläre Anreicherung mehrere sich überlagernde Prozesse, d. h. energieunabhängige passive bzw. erleichterte Diffusion und energieabhängiger aktiver Transport (Energieförderer ist das elektrochemische Potential des Na^+ -Gradienten), verantwortlich zu sein [121].

8. Platinierung von DNA in MCF-7-Zellen

Die Tatsache, daß Platinkomplexe prinzipiell mit DNA reagieren und auch in der Lage sind Crosslinks auszubilden, ist noch keine ausreichende Voraussetzung für Antitumoraktivität [263].

Messungen der Platingehalte von DNA aus MCF-7-Brustkrebszellen, die mit Cisplatin und unterschiedlich substituierten Diaqua(1,2-diphenylethylendiamin)platin(II)-Komplexen behandelt worden waren, ergaben keine Korrelation der Antitumorwirkung mit dem Ausmaß der DNA-Platinierung [104].

Am deutlichsten zeigt sich diese Diskrepanz bei Cisplatin und [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]sulfatoplatin(II). Obwohl letztere Verbindung im Chemosensitivitätstest unwirksam ist, liegt der Platingehalt der DNA nach 24-stündiger Exposition der Zellen im Vergleich zu Cisplatin, das eine ausgeprägte Antitumoraktivität besitzt, nur unwesentlich (um den Faktor 1,3) niedriger [104].

Aufgrund dieser Untersuchungen und der Ergebnisse der nachfolgend beschriebenen Mutagenitätstests, scheinen für die Antitumorwirkung eher die Qualität der Platin-DNA-Bindung und die Geschwindigkeit der Koordination [104] die kritischen Faktoren zu sein. Vermutlich sind aber für die Wirkung isomerer (1,2-Diphenylethylendiamin)platin(II)-Komplexe nicht nur Anzahl und Art der Platin-DNA-Addukte, sondern auch lokale Störungen der DNA-Struktur, die auf Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Strukturelementen (F, Cl oder OH) der Aminliganden beruhen, von Bedeutung.

9. Toxizität und Mutagenität

Obwohl ausführliche Studien über die akute und chronische Toxizität von (1,2-Diphenylethyldiamin)platin(II)-Komplexen bis jetzt noch ausstehen, gibt es dennoch Hinweise, daß einzelne Vertreter dieser Substanzklasse im Vergleich mit Cisplatin hinsichtlich der Dosis-limitierenden Nebenwirkungen möglicherweise Vorteile besitzen [69, 70, 78, 244].

Besonders interessant erscheint in diesem Zusammenhang [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethyldiamin]platin(II), eine Verbindung, die - trotz des Fehlens der für antineoplastisch wirksame Cisplatin-Analoga charakteristischen in-vitro-Zytotoxizität [63, 104] - sogar bei peroraler Applikation [244] gegen hormonsensitive Nagertumoren in vivo hochwirksam ist [78, 156, 196, 197]. Im Gegensatz zu Cisplatin war bei diesem Platin-komplex nach s. c. Injektionen über einen Zeitraum von 25 Wochen mit den üblichen histopathologischen Methoden bei SD-Ratten keine Schädigung der Nieren nachweisbar [78, 244]. Abgesehen von einer vorübergehenden, leichten normochromen Anämie wurden auch bei der Langzeittherapie keine Blutbildveränderungen beobachtet [78, 244].

Das Auftreten von Sekundärtumoren als Folge einer Chemotherapie mit klassischen Alkylantien gilt inzwischen als gesichert [264]. In letzter Zeit werden sekundäre Leukämien auch mit der Cisplatin-Therapie primärer Malignome in Zusammenhang gebracht [264-266]. Da aber Cisplatin in den allermeisten Fällen in Kombination mit anderen Chemotherapeutika verwendet wird, ist bis jetzt noch unklar, ob Cisplatin alleine für die Entstehung von sekundären Krebsarten verantwortlich ist [267].

Die mutagenen und karzinogenen Eigenschaften von Cisplatin und den antineoplastisch wirksamen Cisplatin-Analoga sind allerdings sowohl in vitro als auch im Tierversuch eindeutig nachgewiesen [268-270].

Im Gegensatz dazu korreliert die Mutagenität unterschiedlich substituierter (1,2-Diphenylethyldiamin)platin(II)-Komplexe im Ames-Test [271, 272] nicht in allen Fällen mit ihrer Antitumorstoffwirkung [273].

Besonders interessant ist in dieser Hinsicht D-17446, ein Platinkomplex, der im Chemosensitivitätstest gegenüber menschlichen Mamma-, Ovarial- und Prostatakarzinom-Zelllinien hochaktiv ist [63, 77, 102, 104] im Ames-Test aber nur schwach mutagen wirkt [273]. Im Gegensatz dazu ist der isomere Platinkomplex mit Fluor in ortho-Stellung bei etwa vergleichbarer Antitumorstoffaktivität [63, 273] stark mutagen.

Im Rahmen einer Diplomarbeit wird zur Zeit der Einfluß der Struktur des Aminliganden auf die Mutagenität und Antitumorwirkung der (1,2-Diphenylethyldiamin)platin(II)-Komplexe näher untersucht [273]. Da bei der Bearbeitung dieser Fragestellung aufgrund der speziellen physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Cisplatin-Analoga herkömmliche Methoden (z. B. Ethidiumbromid-Fluoreszenz, alkalische Elution) versagten [121], werden jetzt biochemische und molekularbiologische Techniken eingesetzt [274].

10. Kombination mit anderen Wirkstoffen

Für die Bewertung potentieller Chemotherapeutika spielt auch die Kombinationsmöglichkeit mit anderen Medikamenten eine Rolle [15].

10.1. Buthioninsulfoximin

D,L-Buthionin-(S,R)-sulfoximin (BSO) [275] hemmt die gamma-Glutamylcystein-Synthetase, das Schlüsselenzym der Gluthationbiosynthese, wodurch der intrazelluläre GSH-Spiegel erniedrigt und die Resistenz bestimmter Tumoren, insbesondere Ovarialkarzinome [221], gegenüber Alkylantien oder Platinkomplexen gelegentlich durchbrochen wird [46, 47, 218, 219].

10.1.1. (-)-[1,2-Bis(2-hydroxyphenyl)ethyldiamin]dichloroplatin(II) und threo-[1-(3-Hydroxyphenyl)-2-phenylethyldiamin]dichloroplatin(II)

Es konnte gezeigt werden, daß durch Vorinkubation von SK-OV-3-Zellen mit BSO eine Sensibilisierung der Zellen gegen bestimmte Platinkomplexe erreicht werden kann. Die Kombination von (-)-di-2-OH bzw. von threo-3-OH führt in vitro zu überadditiven Hemmungen [65, 66, 101, 103].

10.1.2. [1,2-Bis(fluorphenyl)ethyldiamin]platin(II)-Komplex

An der Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 und an der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde der Einfluß einer Reduktion des GSH-Spiegels auf die proliferationshemmende Wirkung der 2F- und 4F- substituierten Racemate und Cisplatin ebenfalls untersucht.

Nach einer Reduktion des intrazellulären Glutathionspiegels mittels BSO wurde an der Ovarialkarzinom-Zelllinie SK-OV-3 für die 2F- und 4F-substituierten Racemate eine gravierende Wirkungsverbesserung erzielt [63]. Da diese Steigerung für Diaqua[1,2-bis(2-fluorphenyl)ethyldiamin]platin(II) Sulfat besonders stark ausgeprägt war, könnte diese Verbindung in Kombination mit BSO für die Therapie des Ovarialkarzinoms interessant sein [276].

10.2. Miltefosine

Miltefosine, ein neues Alkylphosphocholin-Derivat ist in vivo v. a. gegen autochthone hormonsensitive Nagertumoren (Dimethylbenz[a]anthrazen- und Methylnitrosoharnstoff-induzierter Brustkrebs der Ratte), wirksam [277, 278]. Bei der Phase-I-Prüfung dieser Verbindung wurde nach topischer Applikation eine Reduktion von Brustkrebsmetastasen festgestellt. Inzwischen ist das Präparat in der BRD für diese Indikation zugelassen.

In in-vivo-Untersuchungen am MXT-M3.2-Mammakarzinom der Maus wurde die selektive Antitumorwirkung von Miltefosine gegen hormonsensitive Tumoren bestätigt [279]. Die hormonunabhängige Variante dieses Transplantationstumors (MXT M3.2-Ovex) wird durch systemische Verabreichung von Miltefosine in ihrem Wachstum nicht beeinflusst [279].

Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß die Antitumorwirkung von Platinkomplexen - wie auch für strukturell verwandte Lysophospholipide beschrieben [280, 281] - durch gleichzeitige Gabe von Miltefosine gesteigert wird [279]. Besonders erwähnenswert ist die Tatsache, daß die wirksamen Kombinationen von Miltefosine und Cisplatin bzw. [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II) sehr gut verträglich sind. [279].

10.3. Neopermease

Bei Neopermease handelt es sich um eine Arzneimittelzubereitung aus Hyaluronidase, einer endo-N-Acetylhexosaminidase aus Rinderhoden und Gelatine als Träger. Das Präparat wird zur Unterstützung klassischer Chemotherapiemaßnahmen bei bestimmten Tumorerkrankungen klinisch eingesetzt [282-284].

Auf der Suche nach neuen Indikationsgebieten wurde die Antitumorwirkung von Neopermease an diversen Mammakarzinommodellen in Kombination mit verschiedenen Zytostatika (u. a. Adriamycin und Platinkomplexe) untersucht [42, 64].

Während die Kombination von hochdosierter Hyaluronidase und Adriamycin zu einer Wirkungssteigerung am MXT-M3.2-Mammakarzinom in vitro und in vivo zu einer Erhöhung der Anthracyclin-Wirkung führte [42, 64], wurde die Antitumorwirkung von Platinkomplexen eher herabgesetzt [64]. Dies ist bei gleichzeitiger Applikation der Platinkomplexe wahrscheinlich auf die Reaktion der Platins mit dem Enzym bzw. dem Träger Gelatine zurückzuführen.

Bei der regionalen Perfusion des malignen Melanoms [42, 285] könnte die bei gleichzeitiger Applikation beobachtete Inaktivierung von Platinkomplexen durch eine zeitlich versetzte Verabreichung von Neopermease eventuell umgangen werden.

VIII. Schlußfolgerungen

Beim Auffinden neuartiger pharmakodynamisch aktiver Strukturen ist man bisher beinahe ausschließlich nach dem "trial- and error"-Verfahren vorgegangen. Dieses Prinzip beruht darauf, daß neue Substanzen beliebig synthetisiert und dann einem allgemeinen, sog. blinden Screening unterworfen werden [287, 288]. Für das Funktionieren dieses Konzepts war die Verfügbarkeit einer Vielzahl von Verbindungen erforderlich, so daß die chemische Synthese bei der Arzneimittelentwicklung zwangsläufig einen breiten Raum einnahm. Diese Vorgehensweise ist allerdings äußerst ineffektiv, da dabei durchschnittlich nur jede zehntausendste Verbindung bis zur Marktreife gelangt.

Zwar war die Arzneimittelforschung als multidisziplinäre Wissenschaft im Grunde seit jeher auf eine enge Kooperation von präparativ arbeitenden Chemikern, Pharmakologen, Bakteriologen, Parasitologen, Pharmazeuten und anderen Spezialisten wie Mathematiker, Physiokochemiker, Immunologen, Pathologen, Biochemiker und Toxikologen angewiesen, der Schwerpunkt lag aber, wie bereits erwähnt, bis vor einigen Jahren auf der chemischen Synthese [286].

Während früher bei der Suche nach therapeutisch interessanten neuen Strukturen meistens der Zufall eine große Rolle gespielt hat [287], werden seit etwa zwei Jahrzehnten zunehmend Verfahren eingesetzt, welche eine rationalere Wirkstoffsuche erlauben [288-290].

Die Folge davon ist, daß die Arzneimittelforschung heute in einem grundlegenden Wandel begriffen ist. Das so lange betriebene "blinde Screening" einer Unmenge neuer, mehr oder weniger zufällig synthetisierter chemischer Substanzen gehört immer mehr der Vergangenheit an. Das Schlagwort in der Pharmazeutischen Chemie heißt heute "rationales Drug-design", d. h. das "Maßschneidern" eines Medikaments [287-293].

Eine der wichtigsten Voraussetzungen hierfür ist die Kenntnis quantitativer Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und pharmakologischer Wirkung einer Verbindung [291-293].

Für quantitative Struktur-Wirkungs-Analysen (QSAR) ist neben der Kenntnis physikalisch-chemischer Parameter die Erhebung exakter biologischer Daten unabdingbar. Für die Gewinnung biologischer Daten ist wiederum die Verfügbarkeit effizienter präklinischer Testsysteme, welche für den jeweiligen Spezialfall entwickelt und optimiert worden sind, Voraussetzung. Daher gewinnen in der Pharmazeutischen Chemie instrumentelle und biochemische Analyseverfahren in Kombination mit zellbiologischen und molekularbiologischen Techniken immer mehr an Bedeutung.

Wie eine moderne Arzneimittelentwicklung für die Krebstherapie heute aussehen kann, wurde im ersten Teil dieser Arbeit ausführlich geschildert.

Durch die Anwendung dieser modernen Testmethoden wurden bei der Suche nach wirksameren Cisplatin-Analoga interessante Leitstrukturen identifiziert und weiter optimiert. Wegen seiner hohen Anreicherung in Tumorzellen [63, 102, 104, 121, 171] ist racem-[1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II) (D-17446) eine der erfolgversprechendsten neuartigen Verbindungen. In dieser Form ist sie jedoch noch kein Kandidat für die klinische Prüfung, da sie kaum wasserlöslich ist und zu einem hohen Anteil irreversibel an Plasmaproteine gebunden wird [63, 102, 121].

Mit Einführung von 1,1'-Cyclobutandicarboxylat als Abgangsgruppe ist es gelungen, das Proteinbindungsvermögen herabzusetzen. Die Wasserlöslichkeit von D17446-Carb ist jedoch für eine in-vivo-Antitumorstoffwirkung immer noch zu gering. Wenn es - wie am Beispiel von D-17446 gezeigt - gelingt, auch D-17446-Carb in eine wasserlösliche Arzneiform (beispielsweise ein Hydrosol [121, 252]) zu überführen, ist nach unserem heutigen Kenntnisstand davon auszugehen, daß dieser neuartige Platinkomplex entsprechend den in-vitro-Daten auch bei Cisplatin-resistenten menschlichen epithelialen Tumoren wie Mamma-, Ovarial- und Prostatakarzinom auch in vivo antineoplastische Aktivität entfaltet.

Im Rahmen dieser Arbeiten hat sich gezeigt, daß eine relativ kleine Arbeitsgruppe, in der Wissenschaftler aus unterschiedlichen Fachbereichen optimal zusammenarbeiten, durchaus in der Lage sein kann, eine Arzneimittelentwicklung bis hin zur klinischen Prüfung voranzutreiben, und daß dieses Forschungsgebiet nicht nur der pharmazeutischen Industrie vorbehalten ist.

IX. LITERATUR

Angesichts der äußerst umfangreichen Originalliteratur zu diesem Thema werden häufig nur Übersichtsartikel zitiert. Die in der Habilitationsschrift zusammengefaßten eigenen Veröffentlichungen sind durch **Fettdruck** gekennzeichnet. Die angegebenen Seitenzahlen beziehen sich auf diese Arbeit. Die vollständigen Literaturzitate sind auf S. 2-5 aufgelistet.

- [1] Einhorn J (1985) Nitrogen mustard: the origin of chemotherapy for cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11: 1375-1378
- [2] Powis G (1991) Toxicity of anticancer drugs to humans. A unique opportunity to study human toxicology. In: Powis G, Hacker MP (eds) *The Toxicity of Anticancer Drugs*. Pergamon Press, New York, pp 1-9
- [3] Autorenkollektiv (1985) Schädigung durch chemische Kampfstoffe. In: *Handbuch der Militärmedizin*, Bd. Innere Militärmedizin, Militärverlag der DDR, Berlin, pp 95-159
- [4] Calabresi P, Chabner BA (1990) Antineoplastic agents. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th edn. , Pergamon Press, New York, pp. 1209-1263
- [5] Berenblum I (1935) Experimental inhibition of tumour induction by mustard gas and other compounds. *J Path Bact* 40: 549-558
- [6] Bruke MB, Wilkes GM, Berg D, Bean CK, Ingwersen K (1991) *Cancer Chemotherapy. A Nursing Process Approach*. Jones and Bartlett Publishers, Boston, p 6
- [7] Goodman LS, Wintrobe MM, Dameshek W, Goodman MJ, Gilman A, McLennan MT (1946) Nitrogen mustard therapy. Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *J Amer Med Ass* 132: 126-132
- [8] DeVita VT (1989) Principles of chemotherapy. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds) *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 3rd edn. , Lippincott, Philadelphia, pp 276-300
- [9] Schmidt CG (1990) Was läßt sich heute mit der antineoplastischen Chemotherapie erreichen? In: Dengler HJ, Schmidt CG (eds) *Klinische Pharmakologie und Onkologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp 4-20
- [10] Malpas JS (1991) Chemotherapy. In: Franks LM, Teich NM (eds) *Introduction to the Cellular & Molecular Biology of Cancer*. 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, pp 451-466
- [11] Hossfeld DK (1992) Was leistet die zytostatische Therapie bei Patienten mit epithelialen Tumoren? *Dt Arztebl* 89 A₁: 1842-1853
- [12] Driscoll JS (1984) The preclinical drug research program of the National Cancer Institute. *Cancer Treat Rep* 68: 63-76
- [13] DeVita VT, Oliverio VT, Muggia FM, Wiernik PW, Ziegler J, Goldin A, Rubin D, Henney J, Schepartz S (1979) The drug development and clinical trials programs of the Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute. *Cancer Clin Trials* 2: 195-216
- [14] Venditti JM (1981) Preclinical drug development: rationale and methods. *Semin Oncol* 8: 349-361

- [15] Goldin A, Carter SK (1982) Screening and evaluation of antitumor agents. In: Holland JF, Frei E (eds) *Cancer Medicine*, 2nd edn. Lea and Febinger, Philadelphia, pp 633-662
- [16] Williams M, Nadzan AM (1991) Drug discovery: an overview. In: Krogsgaard-Larsen P, Bundgaard H (eds) *A Textbook of Drug Design and Development*. Harwood Academic Publishers, Chur, pp 1-25
- [17] Sikic BI (1991) Anticancer drug discovery. *J Natl Cancer Inst* 83: 738-740
- [18] Rosenberg B (1985) Fundamental studies with cisplatin. *Cancer* 55: 2303-2316
- [19] Goldin A (1968) Preclinical methodology for the selection of anticancer agents. In: Busch H (ed) *Methods in Cancer Research*, Vol. IV, Academic Press, New York, pp 193-254
- [20] Goldin A, Schepartz SA, Venditti JM, DeVita VT (1979) Historical development and current strategy of the National Cancer Institute Drug Development Program. In: Busch H, DeVita VT (eds) *Methods in Cancer Research*, Vol. XVI, Academic Press, New York, pp 165-245
- [21] Venditti JM (1983) The National Cancer Institute antitumor drug discovery program, current and future perspectives: a commentary. *Cancer Treat Rep* 67: 767-772
- [22] Shoemaker RH, Wolpert-DeFilippes MK, Kern DH, Lieber MM, Makuch RW, Melnick, NR, Miller WT, Salmon SE, Simon RM, Venditti JM, Von Hoff DD (1985) Application of a human tumor colony-forming assay to new drug screening. *Cancer Res* 45: 2145-2153
- [23] Corbett TH, Valeriote FA, Baker LH (1987) Is the P388 murine tumor no longer adequate as a drug discovery model? *Investigational New Drugs* 5: 3-20
- [24] Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48: 589-601
- [25] Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48: 4827-4833
- [26] Boyd MR, Shoemaker RH, McLemore TL, Johnston MR, Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Fine DL, Mayo JG, Chabner BA (1989) New drug development. In: Roth JA, Ruckdeschel JC, Weisenburger TH (eds) *Thoracic Oncology*. Saunders, Philadelphia, pp 711-721
- [27] Grindey GB (1990) Current status of cancer drug development: failure or limited success? *Cancer Cells* 2: 163-171
- [28] Johnson KJ (1990) Screening methods in antineoplastic drug discovery. *J Natl Cancer Inst* 82: 1082-1083
- [29] Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero DA, Monks A, Boyd MR (1990) Comparison of in vitro anticancer-drug screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 82: 1113-1118
- [30] Kerkvliet GJ (1990) Drug discovery screen adapts to changes. *J Natl Cancer Inst*, 82: 1087-1088
- [31] Chabner BA (1990) In defense of cell-line screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1083-85
- [32] Bernhardt G, Spruß T, Schönenberger H (1991) Einsatz menschlicher Tumorzellkulturen als Testmodelle bei der Entwicklung von Wirkstoffen für die Krebstherapie. pp 147-151

- [33] Spruß T, Bernhardt G, Schickaneder E, Schönenberger H (1991) Different response of murine and human mammary tumour models to a series of diastereoisomeric [1,2-bis(difluorophenyl)ethylenedia-mine]dichloroplatinum(II) complexes. pp 158-166
- [34] Bernhardt G, Reile H, Birnböck H, Spruß T, Schönenberger H (1992) Standardized kinetic microassay to quantitate differential chemosensitivity based on proliferative activity. pp 175-183
- [35] Workman P, D'Incalci M, Berdel WE, Egorin MJ, Hélène C, Hickman JA, Jarman M, Schwartzmann G, Sikora K (1992) New approaches in cancer pharmacology: drug design and development. Report of a Euro-pean School of Oncology Task Force. Eur J Cancer 28A: 1190-1200
- [36] Gellhorn A, Hirschberg E (1955) Investigation of diverse systems for cancer chemotherapy screening. Cancer Res 15, Suppl 3: 1-125
- [37] Garrod, DR (1990) Biology of cancer. In Williams Ch (ed) Cancer Biology and Management: An Intro-duction. John Wiley, Chichester, pp 21-52
- [38] Roberts AB, Sporn MB (1989) Principles of molecular cell biology of cancer: growth factors related to transformation. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds) Cancer Principles and Practice of Oncology, 3rd edn. , Lippincott, Philadelphia, pp 67-80
- [39] Mainwaring WIP (1991) Hormones and cancer In: Franks LM, Teich NM (eds) Introduction to the Cellu-lar & Molecular Biology of Cancer. 2nd edn. , Oxford University Press, Oxford, pp 357-385
- [40] Danforth DN Jr (1992) Hormone receptors in malignancy. Critical Reviews in Oncology/Hematology 12: 91-149
- [41] Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1989) Principles of molecular cell biology of cancer: cancer metasta-sis. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds) Cancer Principles and Practice of Oncology, 3rd edn. , Lippincott, Philadelphia, pp 98-115
- [42] Beckenlehner K, Bannke S, Spruß T, Bernhardt G, Schönenberger H (1992) Hyaluronidase enhan-ces the activity of Adriamycin in breast cancer models in vitro and in vivo. pp 222-227
- [43] Hakala MT, Rustum YM (1979) The potential value of in vitro screening. In: Busch H, DeVita VT (eds) Methods in Cancer Research, Vol. XVI, Academic Press, New York, pp 247-287
- [44] Byfield JE, Calabro-Jones PM (1981) Carrier-dependent and independent transport of anti-cancer alkyla-ting agents. Nature 294: 281-283
- [45] Roninson IB (ed) (1991) Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells. Ple-num Press, New York
- [46] de Graeff A, Slebos RJC, Rodenhuis S (1988) Resistance to cisplatin and analogues: mechanisms and potential clinical implications. Cancer Chemother Pharmacol 22: 325-332
- [47] Timmer-Bosscha H, Mulder NH, de Vries EGE (1992) Modulation of cis-diammindichloroplatinum(II) resistance: a review. Br J Cancer 66: 227-238
- [48] Schönenberger H, Hartmann RW (1985) Hormone und Antihormone. In Kleemann A, Lindner E, Engel J (eds) Arzneimittel Fortschritte 1972 bis 1985. Verlag Chemie, Weinheim pp 1308-1366
- [49] Marsoni S, Hoth D, Simon R, Leyland-Jones B, De Rosa M, Wittes RE (1987) Clinical drug develop-ment: an analysis of phase II trials, 1970-1985. Cancer Treat Rep 71: 71-80

- [50] Muggia FM (1987) Closing the loop: providing feedback on drug development. *Cancer Treat Rep* 71: 1-2
- [51] Boyd MR (1989) Status of the National Cancer Institute preclinical antitumor drug discovery screen: implications for selection of new agents for clinical trial. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds) *Cancer Principles and Practice of Oncology*, update, vol 3, no. 10, Lippincott, Philadelphia, pp 1-12
- [52] Monks A, Scudiero D, Shoemaker R, Paull K, Fine, D, Mayo J, Boyd M (1988) Implementation of a pilot scale anticancer drug screening program utilizing disease-oriented panels of human tumor cell lines. *Proc Am Assoc Cancer Res* 29: 488
- [53] Finlay GJ, Baguley BC (1984) The use of human cancer cell lines as a primary screening system for anti-neoplastic compounds. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20: 947- 954
- [54] Phillips RM, Bibby MC, Double JA (1990) A critical appraisal of the predictive value of in vitro chemosensitivity assays. *J Natl Cancer Inst* 82: 1457-1468
- [55] Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaingro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 83: 757-766
- [56] Hendriks HR, Henrar REC, Pinedo HM, Schwartzmann G (1992) New anticancer drug development within the EORTC-NDDO. In: Fiebig HH, Berger DP (eds) *Immunodeficient Mice in Oncology*. *Contrib Oncol Basel*, Karger, vol 42, pp 306-320
- [57] Skeel RT (1991) (ed) *Handbook of Cancer Chemotherapy*, 3rd edn. Little, Brown, Boston
- [58] Dykes DJ, Abbott BJ, Mayo JG, Harrison SD Jr, Laster WR Jr, Simpson-Herren L, Griswold DP Jr. (1992) Development of human tumor xenograft models for in vivo evaluation of new antitumor drugs. In: Fiebig HH, Berger DP (eds) *Immunodeficient Mice in Oncology*. *Contrib Oncol Basel*, Karger, vol 42, pp 1-22
- [59] Berger DP, Winterhalter BR, Fiebig HH (1992) Establishment and characterization of human tumor xenografts in thymus-aplastic nude mice. In: Fiebig HH, Berger DP (eds) *Immunodeficient Mice in Oncology*. *Contrib Oncol Basel*, Karger, vol 42, pp 23-46
- [60] Fodstad Ø (1992) Preclinical drug evaluation in human tumor xenografts. In: Fiebig HH, Berger DP (eds) *Immunodeficient Mice in Oncology*. *Contrib Oncol Basel*, Karger, vol 42, pp 352-361
- [61] Bernhardt G, Spruß T, Reile H (1990) Etablierung und Weiterentwicklung tumorpharmakologischer Testsysteme. In: Schmähl D, Peukert M (eds) *Regensburger Universitätskolloquium: Fortschritte in der medizinischen Forschung 1989*. Schattauer, Stuttgart, New York, p 152
- [62] Fiebig HH, Berger DP, Dengler WA, Wallbrecher E, Winterhalter BR (1992) Combined in vitro/in vivo test procedure with human tumor xenografts for new drug development. In: Fiebig HH, Berger DP (eds) *Immunodeficient Mice in Oncology*. *Contrib Oncol Basel*, Karger, vol 42, pp 321-351
- [63] Reile H (1991) Entwicklung von Testkonzepten zur Untersuchung der Wirkung isomerer 1,2-Bis(fluorphenyl)ethylendiaminplatin(II) Komplexe am menschlichen Mamma- und Ovarialkarzinom. Dissertation, Universität Regensburg
- [64] Beckenlehner K (1991) Etablierung und Charakterisierung muriner Mammacarcinom-Zelllinien (MXT) zur vergleichenden Prüfung neuer Antitumorwirkstoffe. Diplomarbeit, Universität Regensburg
- [65] Keller Ch (1990) Untersuchungen zur Wirkung von [1,2-Bis(2-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)- und [(Hydroxyphenyl)-2-phenylethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexen an menschlichen Ovarialkarzinom-Modellen. Diplomarbeit, Universität Regensburg

- [66] Bernhardt G, Müller R, Gust R, Reile H, Keller C, Spruß T, Schönenberger H (1992) Dichloro[1-(hydroxyphenyl)-2-phenylethylenediamine]platinum(II) complexes. Testing on the human ovarian cancer cell lines NIH-OVCAR-3 and SK-OV-3. pp 190-196
- [67] Bernhardt G, Gust R, Reile H, vom Orde H-D, Müller R, Keller C, Spruß T, Schönenberger H, Burgemeister T, Mannschreck A, Range K-J, Klement U (1992) [1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II), a new compound for the therapy of ovarian cancer. Part II: Synthesis and preliminary testing of the enantiomeric complexes. pp 197-204
- [68] Bannke S (1992) Prüfung der direkten Wirkung von LHRH-Antagonisten am Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinom. Diplomarbeit, Universität Regensburg
- [69] Christl C (1992) Testmodelle zur Entwicklung von Wirkstoffen für die Therapie des malignen Melanoms. Diplomarbeit, Universität Regensburg
- [70] Spruß T, Bernhardt G, unveröffentlichte Ergebnisse
- [71] Whang-Peng J, Lee EC, Kao-Shan C-S, Seibert K, Lippman M (1983) Cytogenetic studies of human breast cancer lines: MCF-7 and derived variant sublines. J Natl Cancer Inst 71: 687-695
- [72] Yunis JJ (1983) The chromosomal basis of human neoplasia. Science 221: 227-236
- [73] Seibert K, Shafie SM, Triche TJ, Whang-Peng JJ, O'Brien SJ, Toney JH, Huff KK, Lippman ME (1983) Clonal variation of MCF-7 breast cancer cells in vitro and in athymic nude mice. Cancer Res 43: 2223-2239
- [74] Reddel RR, Alexander IE, Koga M, Shine J, Sutherland RL (1988) Genetic instability and the development of steroid hormone insensitivity in cultured T 47D human breast cancer cells. Cancer Res 48: 4340-4347
- [75] Hay RJ (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Anal Biochem 171: 225-237
- [76] Hay RJ (1992) Cell line preservation and characterization. In: Freshney RI (ed) Animal Cell Culture: A Practical Approach. 2nd edn. , IRL Press, Oxford, pp 95-148
- [77] Bernhardt G, Spruß T, unveröffentlichte Ergebnisse
- [78] Spruß T (1988) Modelle zur Untersuchung von Platinkomplexen mit hormoneller und cytotoxischer Aktivität. Dissertation, Universität Regensburg
- [79] Carlsson J, Nederman T (1989) Tumour spheroid technology in cancer therapy research. Eur J Cancer Clin Oncol 25: 1127-1133
- [80] Dendy PP (ed) (1976) Human Tumours in Short Term Culture: Techniques and Clinical Applications. Academic Press, London
- [81] Hamburger AW (1981) Use of in vitro tests in predictive cancer chemotherapy. J Natl Cancer Inst 66: 981-988
- [82] Dendy PP, Hill BT (eds) (1983) Human Tumour Drug Sensitivity Testing in Vitro: Techniques and Clinical Applications. Academic Press, London
- [83] Weisenthal LM, Lippman ME (1985) Clonogenic and nonclonogenic in vitro chemosensitivity assays. Cancer Treat Rep 69: 615-632
- [84] Wilson AP (1986) Cytotoxicity and viability assays. In: Freshney RI (ed) Animal Cell Culture: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, pp 183-216

- [85] Wilson AP (1992) Cytotoxicity and viability assays. In: Freshney RI (ed) *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. 2nd edn. , IRL Press, Oxford, pp 263-303
- [86] Freshney RI, Paul J, Kane IM (1975) Assay of anti-cancer drugs in tissue culture: conditions affecting their ability to incorporate ^3H -leucine after drug treatment. *Br. J. Cancer* 31: 89-99
- [87] Arteaga CL, Forseth BJ, Clark GM, von Hoff DD (1987) A radiometric method for evaluation of chemotherapy sensitivity: results of screening a panel of human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 47: 6248-6253
- [88] Scheithauer W, Temsch EM, Stefeneli T, Lathan B (1988) Ergebnisse experimenteller Untersuchungen des zytostatikamodulierenden Effektes von Hyaluronidase bei gastrointestinalen Karzinomzelllinien. *Wien klin Wschr* 178 (Suppl):12-13
- [89] Roper PR, Drewinko B (1976) Comparison of in vitro methods to determine drug- induced cell lethality. *Cancer Res* 36: 2182-2188
- [90] Shoemaker RH (1986) New approaches to human tumor drug screening: the human tumor colony forming assay. *Cancer Treat Rep* 70: 9-12
- [91] Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63
- [92] Ruben RL, Neubauer RH (1987) Semiautomated colorimetric assay for in vitro screening of anticancer compounds. *Cancer Treat Rep* 71: 1141-1149
- [93] Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna, JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay; assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942
- [94] Reile H, Birnböck H, Bernhardt G, Spruß T, Schönenberger H (1990) Computerized determination of growth kinetic curves and doubling times from cells in microculture. pp 109-114
- [95] Sobottka SB, Berger MR (1992) Assessment of antineoplastic agents by MTT assay: partial underestimation of antiproliferative properties. *Cancer Chemother Pharmacol* 30: 385-393
- [96] Kämmerer A, Bernhardt G (1989) Experimentelle Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Metaboliten aus *Paxillus atrotomentosus* (Batsch:Fr.) pp 86-99
- [97] Reile H, Bernhardt G, Birnböck H, Spruß T, Schönenberger H (1989) Computer aided colorimetric microassay for chemosensitivity evaluation based on doubling time analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 115(Suppl): 26
- [98] Reile H, Bernhardt G, Birnböck H, Spruß T, Schönenberger H (1990) Photometrische Bestimmung von Generationszeiten - eine Methode zur Bewertung antineoplastischer Wirkstoffe. In: Schmähl D, Peukert M (eds) *Regensburger Universitätskolloquium: Fortschritte in der medizinischen Forschung 1989*. Schattauer, Stuttgart, New York, pp 151
- [99] vom Orde H-D, Reile H, Müller R, Gust R, Bernhardt G, Spruß T, Schönenberger H, Burgemeister T, Mannschreck A (1990) Tumor-inhibiting [1,2-bis(fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes V. Synthesis and evaluation of enantiomeric [1,2-bis(4-fluorophenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II) complexes. pp 137-141
- [100] Altman J, Castrillo T, Beck W, Bernhardt G, Schönenberger H (1991) Metal complexes with biologically important ligands 62. Platinum(II) complexes of 3-(2-aminoethoxy)estrone and -estradiol. pp 152-155

- [101] Schönenberger H, Bernhardt G, Gust R, Müller R, Spruß T, vom Orde H-D, Keller Ch (1991) Entwicklung von Platinkomplexen zur Behandlung des Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinoms. pp 167-174
- [102] Bernhardt G, Reile H, Spruß T, Koch M, Gust R, Schönenberger H, Hollstein M, Lux F, Engel J (1991) D-17446 (+/-)-(D,L)-[1,2-Bis(4-fluorophenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II). pp 184-189
- [103] Bernhardt G, Gust R, Reile H, vom Orde H-D, Müller R, Keller C, Spruß T, Schönenberger H, Burgemeister T, Mannschreck A, Range K-J, Klement U (1992) [1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II), a new compound for the therapy of ovarian cancer. Part III: Detailed evaluation of the antitumour activity of the enantiomeric complexes on the human NIH-OVCAR-3 ovarian cancer cell line. pp 205-211
- [104] Reile H, Bernhardt G, Koch M, Schönenberger H, Hollstein M, Lux F (1992) Chemosensitivity of human MCF-7 breast cancer cells to diastereoisomeric diaqua[1,2-diphenylethylenediamine]platinum(II)-sulfates and specific platinum accumulation. pp 212-221
- [105] Kritzenberger J, Bernhardt G, Gust R, Pistor P, Schönenberger H, Yersin H (1992) Dichlorobis-(cycloalkylamine)platinum(II) complexes - structure activity relationship on the human MDA-MB-231 breast cancer cell line. pp 254-271
- [106] Gillies RJ, Didier N, Denton M (1986) Determination of cell number in monolayer cultures. Anal Biochem 159: 109-113
- [107] Kueng W, Silber E, Eppenberger U (1989) Quantification of cells cultured on 96-well plates. Anal Biochem 182: 16-19
- [108] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J Natl Cancer Res 82: 1107-1112
- [109] Keepers YP, Pizao PE, Peters GJ, van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo HM (1991) Comparison of the Sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. Eur J Cancer 27: 897-900
- [110] Lillie RD (1977) HJ Conn's Biological Stains, 9th edn. , Williams & Wilkins, Baltimore
- [111] Kiernan JA (1981) Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. Pergamon Press, Oxford
- [112] Birnböck H (1988) Untersuchungen zur Pharmakokinetik des Zindoxifens und zur Wirkung von Inhibitoren der Steroidsulfatase an hormonabhängigen Tumoren. Dissertation, Universität Regensburg
- [113] Reddel RR, Murphy LC, Hall RE, Sutherland RL (1985) Differential sensitivity of human breast cancer cell lines to the growth inhibitory effects of tamoxifen. Cancer Res 45: 1525-1531
- [114] Skehan P, Friedman SJ (1984) Nonexponential growth by mammalian cells in culture. Cell Tiss Kinet 17: 335-343
- [115] Skehan P (1986) On the normality of growth dynamics of neoplasms in vivo: A data base analysis. Growth 50: 496-515
- [116] Reddel RR, Sutherland RL (1987) Effects of pharmacological concentrations of estrogens on proliferation and cell cycle kinetics of human breast cancer cell lines in-vitro. Cancer Res 47: 5323-5329

- [117] Sartorelli AC, Creasey WA (1982) Combination chemotherapy. In: Holland JF, Frei E (eds) *Cancer Medicine*, 2nd edn. , Lea and Febinger, Philadelphia, pp 720-752
- [118] Tannock IF (1989) Principles of cell proliferation: cell kinetics. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds) *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 3rd edn. , Lippincott, Philadelphia, pp 3-13
- [119] Skehan P, Thomas, J, Friedman SJ (1986) Postconfluency MDCK monolayers as an in vitro model of solid tumor chemosensitivity. *Cell Biol Toxicol* 2: 357-368
- [120] Paull KD, Shoemaker RH, Hodes L, Monks A, Scudiero DA, Rubinstein L, Plowman J, Boyd MR (1989) Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human tumor cell lines: development of mean graph and COMPARE algorithm. *J Natl Cancer Inst* 81: 1088-1092
- [121] Koch M (1993) Optimierung analytischer Methoden (AAS, HPLC) zur Weiterentwicklung neuartiger Platin(II) Komplexe. Vergleichende Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung, Proteinbindung und Aufnahme in Tumorzellen. Dissertation, Universität Regensburg.
- [122] Spruß T, Bernhardt G (1992) Reduktion von Tierzahl und Tierbelastung in tumorpharmakologischen Experimenten durch eine computergestützte in vitro Methode.
XXX. Wissenschaftlich Tagung der GV-SOLAS in Salzburg, 22-25 September 1992
- [123] Fortmeyer HP (1981) Thymusaplastische Maus (nu/nu), Thymusaplastische Ratte (rnu/rnu): Haltung, Zucht, Versuchsmodelle. Paul Parey, Berlin
- [124] Spruß T, Bernhardt G, in Vorbereitung
- [125] Bernhardt G, Spruß T, Rustler M (1992) Comparison of MCF-7 and ZR-75-1 cell lines as models for studying hormone dependent human breast cancer in nude mice. pp 228-230
- [126] Spruß T, Bernhardt G, Rustler M (1992) Characterization of ovarian carcinomas NIH-OVCAR-3 and SK-OV-3 growing in the ovary of nude mice. pp 231-233
- [127] Spruß T, Bannke S, Bernhardt G, Schönenberger H (1992) Activity of the LH-RH antagonist cetrorelix (SB-75) against human ovarian carcinoma in-vitro and in-vivo. *Annals Oncol* 3(Suppl 1): 397
- [128] Grimm D, Hofstädter F, Bauer J, Spruß T, Steinbach P, Bernhardt G, Menze R (1992) Establishment and characterization of a human papillary thyroid carcinoma cell line with oxyphilic differentiation (ONCO-DG 1). *Virchows Archiv B Cell Pathol* 62: 97-104
- [129] Double JA, Bibby MC (1989) Therapeutic Index: a vital component in selection of anticancer agents for clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 81: 988-994
- [130] Prestayko AW, Crooke ST, Carter SK (1980) (eds) *Cisplatin: Current Status and New Developments*. Academic Press, London
- [131] Connors T (1981) Platinum Compounds. In: Holland JF, Frei E (eds) *Cancer Medicine*, 2nd edn. Lea and Febinger, Philadelphia, pp 843-850
- [132] Lippert B, Beck W (1983) Platin-Komplexe in der Krebstherapie. *Chemie in unserer Zeit* 17: 190-199
- [133] Hacker MP, Douple EB, Krakoff IH (1984) (eds), *Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy*. Martinus Nijhoff Publishing, Boston
- [134] Barnard CFJ, Cleare MJ, Hydes PC (1986) Second generation anticancer platinum compounds. *Chemistry in Britain*, November 1986: 1001-1004

- [135] Mc Brian DCH, Slater TF (eds) (1986) *Biochemical Mechanisms of Platinum Antitumour Drugs*. IRL Press, Oxford
- [136] Dabrowiak JC, Bradner WT (1987) Platinum Antitumour agents. In: Ellis GP, West GB (eds) *Progress in Medicinal Chemistry*, Elsevier Science Publishers, B. V. , vol 24: 129-158
- [137] Nicolini M (ed) (1988) *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*. Martinus Nijhoff Publishing, Boston
- [138] Reed E, Kohn KW (1990) Platinum analogues. In: Chabner BA, Collins JM (eds), *Cancer Chemotherapy, principles & practice*. J. B. Lippincott Company, Philadelphia, pp 465-490
- [139] Mc Keage MJ, Higgins III JD, Kelland LR (1991) Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy. A commentary on the sixth international symposium: San Diego, California, 23-26th January 1991. *Br J Cancer* 64: 788-792
- [140] Howell SB (ed) (1991) *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*. Plenum Press, New York
- [141] Burkert H, Herdrich K (1989) *Ausgewählte Therapie-Schemata bei malignen Tumoren*. Asta Pharma AG, Frankfurt/M
- [142] Einhorn LH, Crawford ED, Shipley WU, Loehrer PJ, Williams SD (1989) Cancer of the testis. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds) *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 3rd edn. , Lippincott, Philadelphia, pp 1071-1098
- [143] Young RC, Fuks Z, Hoskins WJ (1989) Cancer of the ovary. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds) *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 3rd edn. , Lippincott, Philadelphia, pp 1162-1196
- [144] Voegeli R, Günther E, Aulenbacher P, Engel J, Hilgard P (1992) Lobaplatin, D-19466. *Drugs of the Future* 17: 883-886
- [145] Cotton AF, Wilkinson G (1968) *Anorganische Chemie*. 2. verbesserte Auflage, Verlag Chemie GmbH, Weinheim
- [146] Howe-Grant ME, Lippard SJ (1980) Aqueous platinum(II) chemistry; binding to biological molecules. In: Sigel H (ed) *Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker, New York, pp 63-125
- [147] Abrams MJ (1990) The chemistry of platinum antitumour agents. In: Wilman DEV (ed) *Chemistry of Antitumour Agents*. Blackie, Glasgow, pp 331-341
- [148] Keppler BK (1987) Metallkomplexe in der Krebstherapie. *Nachr Chem Tech Lab* 35: 1029-1036
- [149] Hollis LS (1991) New approaches to the design of platinum antitumor agents. In: Howell SB (ed) *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*. Plenum Press, New York, pp 115-125
- [150] Pasini A, Zunino F (1987) Neue Cisplatin-Analoga - auf dem Weg zu besseren Cancerostatica. *Angew Chem* 99: 632-641
- [151] Budavari S (1989) (ed) *The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. Merck & Co. , Inc. , Rahway, NJ
- [152] Jøns O, Johansen ES (1991) Bio-Inorganic chemistry. In: Krogsgaard-Larsen P, Bundgaard H (eds) *A Textbook of Drug Design and Development*. Harwood Academic Publishers, Chur, pp 92-112

- [153] Farrell N (1991) Structurally novel Platinum antitumor compounds. In: Howell SB (ed) *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*. Plenum Press, New York, pp 81-91
- [154] Kidani Y, Noji M (1991) Developmental approach to prepare new types of antitumor platinum complexes with dual function. In: Howell SB (ed) *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*. Plenum Press, New York, pp 127-137
- [155] Wappes B, Jennerwein M, von Angerer E, Schönenberger H, Engel J, Berger MR, Wrobel KH (1984) Dichloro[1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes: an approach to develop compounds with a specific effect on the hormone-dependent mammary carcinoma. *J Med Chem* 27: 1280-1286
- [156] Schönenberger H, Gust R, Karl J, Spruß Th, Schneider, MR, Hartmann RW, Batzl Ch, Schertl S, Engel J, Lux F, Trebert-Haeblerlin S (1989) Rezeptorgebundene Chemotherapie. In: *Antiöstrogene in Forschung und Klinik, Reihe Aktuelle Onkologie* 46, Zuckschwerdt Verlag, München, pp 71-86
- [157] Knebel NG, von Angerer E (1991) 2-Phenylindole-linked [2-(aminoalkyl)pyridine]dichloroplatinum(II): complexes with a selective action on estrogen receptor positive mammary tumours. *J Med Chem* 34: 2145-2152
- [158] Bednarski PJ (1992) Relationships between the aqueous chemistry and the in vitro cytotoxic activities of mixed-amine cisplatin analogues. *Biochem Pharmacol* 43: 2609-2620
- [159] Kelland LR, Murrer BA, Abel G, Giandomenico CM, Mistry P, Harrap KR (1992) Ammine/amine platinum(IV) dicarboxylates: a novel class of platinum complex exhibiting selective cytotoxicity to intrinsically cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res* 52: 822-828
- [160] Loh SY, Mistry P, Kelland LR, Abel G, Harrap KR (1992) Reduced drug accumulation as a major mechanism of acquired resistance to cisplatin in a human ovarian carcinoma cell line: circumvention studies using novel platinum(II) and (IV) ammine/amine complexes. *Br J Cancer* 66: 1109-1115
- [161] Kjølner-Larsen I (1991) DNA and cell growth in chemotherapy of cancer. In: Krogsgaard-Larsen P, Bundgaard H (eds) *A Textbook of Drug Design and Development*. Harwood Academic Publishers, Chur, pp 192-241
- [162] Hambley TW (1988) Modelling the interaction of cisplatin with DNA. *Drug Design and Delivery* 3: 153-158
- [163] Brown DB, Khokhar AR, Hacker MP, Mc Cormack JJ (1982) Synthesis and antitumor activity of platinum complexes containing neutral and protonated amino-olefin ligands. *Inorg Chim Acta* 67: 45-52
- [164] Brown DB, Khokhar AR, Hacker MP, Lokys L, Burchenal JH, Newman RA, Mc Cormack JJ, Frost D (1982) Synthesis and antitumor activity of new platinum complexes. *J Med Chem* 25: 952-956
- [165] Köpf-Maier P, Köpf H, Neuse EW (1984) Ferricenium complexes: a new type of water soluble antitumor agent. *J Cancer Res Clin Oncol* 108: 336-340
- [166] Müller R, Gust R, Jennerwein M, Reile H, Laske R, Krischke W, Bernhardt G, Spruß T, Engel J, Schönenberger H (1989) Tumor inhibiting [1,2-bis(fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes. Part I: Synthesis. pp 100-108
- [167] Reile H, Müller R, Gust R, Laske R, Krischke W, Bernhardt G, Spruß T, Jennerwein M, Engel J, Seeber S, Osieka R, Schönenberger H (1990) Tumor inhibiting [1,2-bis(fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes Part II: Biological evaluation in-vitro studies on the P-388-D₁ leukemia cell line. pp 123-130

- [168] Gust R, Burgemeister Th, Mannschreck A, Schönenberger H (1990) Aqua[1-(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)-2-phenylethylenediamine]sulfatoplatinum(II) complexes with variable substituents in the 2-phenyl ring. 1. Synthesis and antitumor and estrogenic properties. *J Med Chem* 33: 2535-2544
- [169] Spruß Th, Gust R, Müller R, Engel J, Schönenberger H (1990) Mammary tumor inhibiting properties of the (S,S)-configured [1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II) complex. *Arch Pharm (Weinheim)* 323: 99-102
- [170] Reile H, Spruß T, Bernhardt G, Müller R, Gust R, Schönenberger H (1991) Tumour inhibiting [1,2-bis(4-fluorophenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II) complexes: IV. Biological evaluation - in vivo studies on the P388 leukemia. pp 142-146
- [171] Koch M, Bernhardt G (1991) Differential accumulation of stereoisomeric [1,2-bis(fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes by human breast cancer cells in vitro. p 156
- [172] Harrap KR, Murrer BA, Giandomenico C, Morgan SE, Kelland LR, Jones M, Goddard PM, Schurig J (1991) Ammine/Amine platinum IV dicarboxylates: a novel class of complexes which circumvent intrinsic cisplatin resistance. In: Howell SB (ed) *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*. Plenum Press, New York, pp 391-399
- [173] Langford CH, Gray HB (1965) *Ligand Substitution Processes*. Benjamin, New York
- [174] Basolo F, Pearson RG (1967) *Mechanisms of Inorganic Reactions*, 2nd edn. John Wiley & Sons, New York
- [175] Tobe ML (1972) *Inorganic Reaction Mechanisms*. Nelson, London
- [176] Hartley FR (1973) *The Chemistry of Platinum and Palladium*. John Wiley & Sons, New York
- [177] Wilkins RG (1974) *The Study of Kinetics and Mechanisms of Reactions of Transition Metal Complexes*. Allyn and Bacon, Boston
- [178] Cotton AF, Wilkinson G (1988) *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th edn. John Wiley & Sons, New York
- [179] Martin RB (1983) Hydrolytic equilibria and N7 versus N1 binding in purine nucleosides of cis-diamminedichloroplatinum(II). Palladium(II) as a guide to platinum(II) reactions at equilibrium. In: Lippard SJ (ed) *ACS Symposium Series* 209: 231-244
- [180] Johnson NP, Butour JL, Villani G, Wimmer FL, Defais M, Pierson V, Brabec V (1989) Metal antitumor compounds: the mechanism of action of platinum complexes. In: *Progress in Clinical Biochemistry and Medicine*, Springer-Verlag Berlin, vol 10: 3-24
- [181] Lippert B (1984) Reaktionen von Cisplatin mit DNA und Modellnukleobasen. *Beitr Oncol*, Karger, Basel, vol 18 pp 36-47
- [182] Reedijk (1987) The mechanism of action of platinum anti-tumor drugs. *Pure & Appl Chem* 59: 181-192
- [183] Sherman SE, Lippard SJ (1987) Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA. *Chem Rev, Bioinorganic Chemistry* 87: 1153-1181
- [184] Lippard SJ (1987) Chemistry and molecular biology of platinum anticancer drugs. *Pure & Appl Chem* 59: 731-742
- [185] Lepre CA, Lippard SJ (1990) Interaction of platinum antitumor compounds with DNA. In: Eckstein F, Lilley DM (eds) *Nucleic Acids and molecular Biology*. Springer-Verlag Berlin, vol 4: 9-38

- [186] Lippard SJ (1991) Platinum DNA Chemistry. In: Howell SB (ed) (1991) Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy. Plenum Press, New York, pp 1-12
- [187] Butour JL, Alvinerie P, Soucard JP, Colson P, Houssier C, Johnson NP (1991) Effect of amine non-leaving group on the structure and stability of DNA complexes with cis-[Pt(R-NH₂)₂(NO₃)₂]. *Eur J Biochem* 202: 975-980
- [188] Bednarski PJ, Türmbach B, Kratochwil N, Schönenberger H (1992) Diamine ligand release from the cisplatin analogue [meso-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatin(II) in cell culture medium. *J Med Chem* 35: 4479-4485
- [189] Mauldin SK, Plescia M, Richard FA, Wyrick SD, Voyksner RD, Chaney SG (1989) Displacement of the bidentate malonate ligand from (d,l-trans-1,2-diaminocyclohexane)malonatoplatinum(II) by physiologically important compounds in vitro. *Biochem Pharmacol* 37: 3321-3333
- [190] Arrick BA, Nathan C F (1984) Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. *Cancer Res* 44: 4224-4232
- [191] Creighton TE (1984) Proteins, Structure and Molecular Properties. Freeman, New York
- [192] Taylor DM, Jones JD, Robins AB (1973) Metabolism of platinum [¹⁴C]ethylenediaminedichloride in the rat. *Biochem Pharmacol* 22: 833-839
- [193] Taylor DM (1978) The pharmacokinetics of cis Pt(II) in animals and in man: relation to treatment scheduling. *Biochimie* 60: 949-956
- [194] Robins AB, Leach MO (1983) Pharmacokinetics of therapeutic doses of isotopically labeled platinum antitumor agents in the mouse and rat. *Biochem Pharmacol* 67: 245-252
- [195] Koop R (1992) Molekulare Wirkmechanismen von Antiestrogenen und Estrogenrezeptor-affinen Platin(II)-Verbindungen. Dissertation, Universität Regensburg
- [196] Karl J, Gust R, Spruss Th, Schneider MR, Schönenberger H, Engel J, Wrobel K- H, Lux F, Trebert Haeberlin S (1988) Ring-substituted [1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum (II) complexes: compounds with a selective effect on the hormone-dependent mammary carcinoma. *J Med Chem* 31: 72-83
- [197] Schneider MR, Schiller C-D, Humm A, Spruß Th, Schönenberger H, Amselgruber W, Sinowatz F (1989) [1,2-Bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II): An endocrine-active platinum complex with a specific prostatic tumor-inhibiting activity. *Prostate* 15: 135-148
- [198] Otto AM, Faderl M, Schönenberger H (1991) Dissociation of estrogenic and cytotoxic properties of an estrogen receptor-binding platinum complex in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 51: 3217-3223
- [199] Otto AM, Bednarski PJ, Eggers H, Türmbach B, Schönenberger H (1992) [meso-1,2-Bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II), an estrogenic Pt(II)-complex for the therapy of breast cancer: relationship between stability and effect. *Pharm Pharmacol Lett* 1: 103-106
- [200] Pinto AL, Lippard SJ (1985) Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochim Biophys Acta* 780: 167-180
- [201] Sorenson CM, Barry MA, Eastman A (1990) Analysis of events associated with cell cycle arrest at G₂ phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst* 82: 749-755
- [202a] Eastman A (1990) Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells*: 2: 275-280

- [202b] Eastman A, Barry M (1991) Activation of a genetic program for cell death. In: Howell SB (ed) *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*. Plenum Press, New York, pp 195-202
- [203] Holler E (im Druck) Mechanism of action of tumor-inhibiting metal complexes. In: Keppler BK (ed) *Metal Complexes in Cancer Therapy*.
- [204] Gale GR, Morris CR, Atkins LM, Smith AB (1973) Binding of an antitumor platinum compound to cells as influenced by physical factors and pharmacologically active agents. *Cancer Res* 33: 813-818
- [205] Rosenberg B (1978) Platinum complex interactions and anticancer activity. *Biochimie* 60: 859-867
- [206] Byfield JE, Calabro-Jones PM (1981) Carrier-dependent and independent transport of anti-cancer alkylating agents. *Nature* 294: 281-283
- [207] Just G, Holler E (1989) Platinum incorporation and differential effects of cis- and trans-diamminedichloroplatin(II) on the growth of mouse leukemia P388/D₁. *Cancer Res* 49: 7072-7077
- [208] Scanlon KJ, Safirstein RL, Thies H, Gross RB, Waxman S, Guttenplan JB (1983) Inhibition of amino acid transport by cis-diamminedichloroplatinum(II) derivatives in L1210 murine leukemia cells. *Cancer Res* 43: 4211-4215
- [209] Andrews PA, Sriharsha V, Mann SC, Howell SB (1988) Cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 48: 68-73
- [210] Andrews PA, Albright KD (1991) Role of membrane ion transport in cisplatin accumulation. In: Howell SB (ed) (1991) *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*. Plenum Press, New York, pp 151-159
- [211] Trebert-Haeberlin S, Lux F, Karl J, Spruß Th, Schönenberger H (1987) Determination of platinum and biologically important trace elements in structure-activity relationship studies on platinum-containing anti-cancer drugs. Special procedures for removing ³²P as well as for the estimation of ⁹⁹Mo and ¹⁹⁹Au. *J Radioanal Nucl Chem* 113: 461-467
- [212] Hacker MP (1991) Toxicity of platinum-based anticancer drugs. In: Powis G, Hacker MP (eds) *The Toxicity of Anticancer Drugs*. Pergamon Press, New York, pp 82-105
- [213] Newell DR, Gore ME (1991) Toxicity of alkylating agents: clinical characteristics and pharmacokinetic determinants. In: Powis G, Hacker MP (eds) *The Toxicity of Anticancer Drugs*. Pergamon Press, New York, pp 44-62
- [214] Hewitt WR, Goldstein RS, Hook JB (1991) Toxic responses of the kidney. In: Amdur MA, Doull J, Klaassen CD (eds) *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*, 4th edn. Pergamon Press, New York, pp 354-382
- [215] Goyer RA (1991) Toxic effects of metals. In: Amdur MA, Doull J, Klaassen CD (eds) *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*, 4th edn. Pergamon Press, New York, pp 623-680
- [216] Macquet JP, Butour JL (1983) Platinum-amine compounds: importance of the labile and inert ligands for their pharmacological activities towards L1210 leukemia cells. *J Natl Cancer Inst* 70: 899-905
- [217] Reile H, Spruß T, Müller R, Gust R, Bernhardt G, Schönenberger H, Engel J (1990) Tumor inhibiting [1,2-bis(fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes, III: evaluation of the mammary tumor inhibiting properties. pp 131-136

- [218] Kelley S, Rozenzweig M (1989) Resistance to platinum compounds: mechanisms and beyond. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25: 1135-1140
- [219] Canon J-L, Humbley Y, Symann M (1990) Resistance to cisplatin: how to deal with the problem? *Eur J Cancer* 26: 1-3
- [220] Bungo M, Fujiwara Y, Kasahara K, Nakagawa K, Ohe Y, Sasaki Y, Irino S, Saijo N (1990) Decreased accumulation as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in human non-small cell lung cancer cell lines: relation to DNA damage and repair. *Cancer Res* 50: 2549-2553
- [221] Andrews PA, Murphy MP, Howell SB (1986) Cellular resistance to platinating agents in ovarian carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 223, *Cancer Drug Resistance* pp 115-128
- [222] Eastman A (1987) Cross-linking of glutathione to DNA by cancer-chemotherapeutic platinum coordination complexes. *Chem Biol Interactions* 61: 241-248
- [223] Sekiya S, Oosaki T, Andoh S, Suzuki N, Akaboshi M, Takamizawa H (1989) Mechanisms of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in a rat ovarian cell line. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25: 429-437
- [224] Masuda H, Tanaka T, Matsuda H, Kusaba I (1990) Increased removal of DNA-bound platinum in a human ovarian cancer cell line resistant to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res* 50: 1863-1866
- [225] Lai GM, Ozols RF, Young RC, Hamilton TC (1989) Effect of glutathione on DNA repair in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 81: 535-539
- [226] Batist G, Cowan KH, Curt G, Katki AG, Myers CE (1985) Increased glutathione-S-transferase activity (GST) in drug treated human breast cancer cells. *Proc Am Assoc Cancer Res* 26: 345
- [227] Teicher BA, Holden SA, Kelley MJ, Shea TC, Cucchi CA, Rosowsky A, Henner WD, Frei E (1987) Characterization of a human squamous carcinoma cell line resistant to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res* 47: 388-393
- [228] Reed E, Ozols RF, Tarone R., et al. (1987) Platinum-DNA adducts in leukocyte DNA correlate with disease response in ovarian cancer patients receiving platinum-based chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5024-5028
- [229] Reed E, Sauerhoff S, Poirier MC (1988) Quantitation of platinum-DNA binding in human tissues following therapeutic levels of drug exposure. *Atomic Spectroscopy* 9: 93-95
- [230] Christian MC, Spriggs D, Tutsch KD, O'Rourke T, VonHoff DD, Jacob JL, Reed E (1991) Phase I trials with ormaplatin (tetraplatin). In: Howell SB (ed) *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*. Plenum Press, New York, pp 453-458
- [231] Misset JL, Kidani Y, Gastiaburu J, Jasmin C, Lévi F, Boughattas N, Lemaigre G, Caussanel JP, Brienza S, Kim Triana B, Goldschmidt E, Musset M, Mauvernay RY, Mathé G (1991) Oxalatoplatinum (I-OHP): Experimental and clinical studies. In: Howell SB (ed) *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*. Plenum Press, New York, 369-375
- [232] Perez-Soler R, Siddik ZH, Vadieli K, Krakoff IH, Khokhar AR (1991) Pharmacological studies with new liposome-entrapped cisplatin-derivatives. In: Howell SB (ed) *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*. Plenum Press, New York, pp 377-389
- [233] de Valeriola D, Forrest A, Dodion P, Crespeigne N, Piccart M, Rastogi R, Kantrowitz JD, Egorin MJ (1991) Clinical and pharmacokinetic studies on the new platinum complex zeniplatin (CL286,558). In: Howell SB (ed) *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*. Plenum Press, New York, pp 357-368

- [234] Majima H (1991) Clinical studies with cisplatin analogues, 254-S, DWA2114R and NK121. In: Howell SB (ed) *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*. Plenum Press, New York, pp 345-355
- [235] Schönenberger H, Kranzfelder G, Hoffmann E, Egginger G, Schmitt H, Taneja AK (1976) Experimentelle Chemotherapie des Mammakrebses. Eine Übersicht. *Pharmazie* 31: 590-597
- [236] Schönenberger H, Wappes B, Jennerwein M, Berger M (1984) Development of selectively acting platinum complexes. *Cancer Treat Rev* 11 (Supl A) 125-130
- [237] Smith IE, Talbot DC (1992) Cisplatin and its analogues in the treatment of advanced breast cancer: a review. *Br J Cancer* 65: 787-793
- [238] Wappes B, Jennerwein M, v. Angerer E, Engel J, Schönenberger H, Brunner H, Schmidt M, Berger M, Schmähl D, Seeber S (1984) The tumor-inhibiting effect of isomeric dichloro(diphenylethylenediamine)platinum(II)-complexes. *J Cancer Res Clin Oncol* 107: 15-20
- [239] Jennerwein M, Wappes B, Gust R, Schönenberger H, Engel J, Seeber S, Osieka R. (1988) Influence of ring substituents on the antitumor effect of dichloro(1,2-diphenylethylenediamine)platinum(II) complexes. *J Cancer Res Clin Oncol* 114: 347-358
- [240] Jennerwein M, Gust R, Müller R, Schönenberger H, Engel J, Berger MR, Schmähl D, Seeber S, Osieka R, Atassi G, Maréchal-De-Bock D (1989) Tumor inhibiting properties of stereoisomeric [1,2-bis(3-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II) complexes, Part I: Synthesis. *Arch Pharm (Weinheim)* 322: 25-29
- [241] Jennerwein M, Gust R, Müller R, Schönenberger H, Engel J, Berger MR, Schmähl D, Seeber S, Osieka R, Atassi G, Maréchal-De-Bock D (1989) Tumor inhibiting properties of stereoisomeric [1,2-bis(3-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II) complexes, Part II: Biological properties. *Arch Pharm (Weinheim)* 322: 67-73
- [242] Schertl S, Gust R, Müller R, Spruß T, Schönenberger H (1992) Stereoisomeric [1,2-Bis(3-hydroxyphenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes, Part III: Evaluation of mammary tumor inhibiting properties. *Arch Pharm (Weinheim)* 325: 113-118
- [243] Karl J, Schönenberger H (1988) Zur Antitumorwirkung o-substituierter [1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe und ihrer Methylether. *Arch Pharm (Weinheim)* 321: 405-410
- [244] Spruß T, Schertl S, Schneider MR, Gust R, Bauer K, Schönenberger H (1993) [Meso-1,2-Bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II), a new drug active subcutaneously but also orally in the therapy of breast and prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, in press
- [245] Müller R, Gust R, Bernhardt G, Keller C, Schönenberger H, Seeber S, Osieka R, Eastman A, Jennerwein M (1990) [D,L-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatinum(II) a new compound for the therapy of ovarian cancer. pp 115-122
- [246] Schlemmer R, Untersuchungen zur immunmodulatorischen Wirkung von [meso-1,2-Bis[2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylenediamin]dichloroplatin(II). Dissertation, in Arbeit
- [247] Brinks SP, Dobrota M (1990) Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine. *Biochem Pharmacol* 40: 1329-1336
- [248] Spruß T, Bernhardt G, Schlemmer R, Schönenberger H (1992) Different response of hormone dependent rodent tumors grown in immunodeficient and immunocompetent hosts to hormone-like therapy. pp 234-244

- [249] Hartmann RW (1983) Tumor growth-stimulating and inhibiting effects of antiestrogens on DMBA-induced mammary carcinoma of the ovariectomized, diethylstilbestrol-treated SD rat. A study on the mechanism of action of antiestrogens. *Eur J Cancer Res Clin Oncol* 19: 959-964
- [250] Gust R, Schönenberger H (1993) Mammary tumor inhibiting [1,2-Bis(2,6-dihalo-3-hydroxyphenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes III: Relationship between structure and estrogenic activity of the diamine ligands, their sulfatoplatinum(II) and diiodoplatinum(II) complexes. *Arch Pharm (Weinheim)*, in press
- [251] Reile H (1987) Zur Antitumorwirkung diastereomerer 1,2-Bis-(fluorphenyl)ethylendiamindichloroplatin-(II)- und Diaqua-1,2-bis(fluorphenyl)ethylendiaminplatin(II)-Komplexe mit Sulfat und Nitrat als Gegenion. Diplomarbeit, Universität Regensburg
- [252] Schertl S, Lu Z, Bauer KH, Spruß T, Bernhardt G, Schönenberger H (1992) Ein parenteral applizierbares Hydrosol für den schwerlöslichen Platin(II)-Komplex D 17446. p 245
- [253] Pfeifer S, Pfügel P, Borchert HH (1988) Grundlagen der Biopharmazie. Pharmakokinetik, Bioverfügbarkeit, Biotransformation. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin
- [254] Pratt W (1990) The entry, distribution, and elimination of drugs. In: Pratt WM, Taylor P (eds) Principles of drug action. The Basis of Pharmacology, 3rd edn. , Churchill Livingstone, New York, pp 201-296
- [255] Fichtl B, Fülgraff G, Neumann HG, Wollenberg P, Forth W, Henschler D, Rummel W (1992) Arzneimittelkonzentration im Organismus in Abhängigkeit von der Zeit (Pharmakokinetik) In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (Hrsg.) Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 6. Aufl. , BI-Wissenschaftsverlag. Mannheim, pp 55-77
- [256] Gonias SL, Pizzo SV (1983) Complexes of serum albumin and cis-dichlorodiammineplatinum(II). *J Biol Chem* 258: 5764-5769
- [257] Holding JD, Lindup WE, Van Laer C, Vreeburg GCM, Schilling V, Wilson JA, Stell PM (1992) Phase I trial of a cisplatin-albumin complex for the treatment of cancer of the head and neck. *Br J Clin Pharmacol* 33: 75-81
- [258] Sacher RA, Mc Pherson RA (1991) Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Tests, 10th edn. , F. A. Davis Company, Philadelphia, pp 357-358
- [259] Bruke MB, Wilkes GM, Berg D, Bean CK, Ingwersen K (1991) Cancer Chemotherapy. A Nursing Process Approach. Jones and Bartlett Publishers, Boston, p 183
- [260] Melvik JE, Dornish JM, Pettersen EO (1992) The binding of cis-dichlorodiammineplatinum(II) to extracellular and intracellular compounds in relation to drug uptake and cytotoxicity in vitro. *Br J Cancer* 66: 260-265
- [261] Darnell J, Lodish H, Baltimore D (1986) Transport across cell membranes. In: Molecular Cell Biology. Scientific American Books Inc. , Freeman, New York, pp 617-666
- [262] Harold FM (1986) Carriers, channels, and pumps. In: The Vital Force. A Study of Bioenergetics. Freeman, New York, pp 303-358
- [263] Palmer BD, Wickham G, Craik DJ, McFadyen WD, Wakelin LPG, Baguley BC, Denny WA (1992) Synthesis, DNA binding interactions and biological activity of bis platinum(II) complexes of N,N,N',N'-tetraakis(2-aminoethyl)diamines. *Anti-Cancer Drug Design* 7: 385-401
- [264] Pratt CB, Pui CH (1991) Second tumours after treatment with anticancer drugs. In: Powis G, Hacker MP (eds) The Toxicity of Anticancer Drugs. Pergamon Press, New York, pp 28-43

- [265] Redman JR, Vugrin D, Arlin ZA, Gee TS, Kempin SJ, Godbold JH, Schottenfeld D, Clarkson BD (1984) Leukemia following treatment of germ cell tumors in man. *J Clin Oncol* 2: 1080-1087
- [266] Bassett WB (1986) Acute Leukemia following cisplatin for bladder cancer. Letter to the editor. *J Clin Oncol* 4: 614
- [267] Greene MH (1992) Is cisplatin a human carcinogen? *J Natl Cancer Inst* 84: 306-312
- [268] Leopold WR, Miller EC, Miller JA (1979) Carcinogenicity of antitumor cis-platinum(II) coordination complexes in the mouse and rat. *Cancer Res* 39: 913-918
- [269] Beck DJ, Fisch JE (1980) Mutagenicity of platinum coordination complexes in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 77: 45-54
- [270] Hannan MA, Al-Dakan AA, Hussain SS, Amer MH (1989) Mutagenicity of cisplatin and carboplatin used alone and in combination with four other anticancer drugs. *Toxicology* 55: 183-191
- [271] Maron DM, Ames BN (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
- [272] Schweikl H, Schmalz G (1991) Evaluation of the mutagenic potential of root canal sealers using the *Salmonella*/microsome assay. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2: 181-185
- [273] Hummel E, Korrelation von Antitumor-Wirkung und Mutagenität bei 1,2-Diphenylethylendiaminplatin(II)-Komplexen, in Arbeit
- [274] Bruhn SL, Toney JH, Lippard SJ (1990) Biological processing of DNA modified by platinum compounds. In: Lippard SJ (ed) *Prog Inorg Chem, Bioinorg Chem*, vol 38, pp 477-516
- [275] Leyland-Jones B, Chun HG, Grem JL, Sarosy G, Dearing MP, Henry WP, Christian MC (1990) Investigational new agents. In: Chabner BA, Collins JM (eds), *Cancer Chemotherapy, principles & practice*. J. B. Lippincott Company, Philadelphia, pp 491-530
- [276] Reile H, Bernhardt G (1991) Effect of BSO on in-vitro chemosensitivity of human breast and ovarian cancer cell lines against [1,2-bis(fluorophenyl)ethylenediamine]platinum(II) complexes. p 157
- [277] Hilgard P, Stekar J, Voegeli R, Engel J, Schumacher W, Eibl HJ, Unger C, Berger MR (1988) Characterization of the antitumor activity of hexadecylphosphocholine (D 18506). *Eur J Cancer Clin Oncol* 24: 1457-1461
- [278] Hilgard P, Kampher E, Nolan L, Pohl J, Reissmann T (1991) Investigation into the immunological effects of miltefosine, a new anticancer agent under development. *J Cancer Res Clin Oncol* 117: 403-408
- [279] Spruß T, Bernhardt G, Schönenberger H, Engel J (1992) Antitumouractivity of miltefosine alone and after combination with platinum complexes on MXT mouse mammary carcinoma models. pp 246-253
- [280] De Cesare M, Dal Bo L, Pratesi G, Zunino F, Giuliani F, Tognella S (1992) Increased antitumor efficacy of cisplatin by ilmofofine combination against xenografted human lung tumors. NCI-EORTC symposium on new drugs in cancer therapy, Amsterdam, March 17-20, 1992, abstract 192
- [281] Herrmann DBJ, Opitz HG, Munder PG (1992) Synergistic antitumor activity of combined oral ilmofofine and i. v. cisplatin in a murine methA fibrosarcoma model. *J Cancer Res Clin Oncol* 118(Suppl): R 141

- [282] Baumgartner G (1987) Hyaluronidase in der Therapie maligner Erkrankungen. *Wien klin Wschr* 174 (Suppl):1-22
- [283] Baumgartner G (ed.) (1988) Hyaluronidase - eine wirksame Substanz in der Behandlung maligner Erkrankungen? Referate gehalten im Rahmen der 6. Arbeitstagung des Ludwig Boltzmann-Instituts für Hämatologie und Leukämieforschung, Wien (11. bis 13. Februar 1988). *Wien klin Wschr* 178 (Suppl):1-23
- [284] Baumgartner G, Moritz A (eds.) (1988) Hyaluronidase: Anwendung in der Onkologie. Springer-Verlag, Wien, New York
- [285] Meyer Th, Göhl J, Hohenberger W, Christl C, Bernhardt G, Spruß Th, Schönenberger H (1993) Untersuchungen zur Wahl des Zytostatikums für die isolierte hypertherme Extremitätenperfusion - Chemosensitivitätstests an 5 humanen Melanom-Zelllinien. *Langenbecks Arch Chir* (im Druck)
- [286] Schröder E, Rufer C, Schmiechen, R (1976) Arzneimittelchemie I. Grundlagen, Nerven, Muskeln und Gewebe. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 1-20
- [287] Bäuml E (1992) Die großen Medikamente. Gustav Lübbe Verlag, Bergisch Gladbach
- [288] Delgado JN, Remers WA (1991) Introduction. In Delgado J, Remers WA (eds) *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. Lippincott, Philadelphia, pp 1-2
- [289] Auterhoff H, Knabe J, Hölzje H-D (1991) *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, pp 59-70
- [290] Yevich JP (1991) Drug development: from discovery to marketing. In: Krogsgaard-Larsen P, Bundgaard H (eds) *A Textbook of Drug Design and Development*. Harwood Academic Publishers, Chur, pp 607-630
- [291] Block JH (1991) Physicochemical properties in relation to biologic action. In Delgado J, Remers WA (eds) *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. Lippincott, Philadelphia, pp 3-43
- [292] Hacksell U (1991) Structural and physicochemical factors in drug action. In: Krogsgaard-Larsen P, Bundgaard H (eds) *A Textbook of Drug Design and Development*. Harwood Academic Publishers, Chur, pp 26-54
- [293] Högberg T, Norinder U (1991) Theoretical and experimental methods in drug design applied on antipsychotic dopamine antagonists. In: Krogsgaard-Larsen P, Bundgaard H (eds) *A Textbook of Drug Design and Development*. Harwood Academic Publishers, Chur, pp 56-91

X. Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Habilitationsschrift selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Gegenstand der eigenen experimentellen Untersuchungen sind die tumorpharmakologischen wirkmechanistischen und toxikologischen Aspekte der gemeinsam publizierten Arbeiten. Dabei wurden schwerpunktmäßig in-vitro-Fragestellungen bearbeitet.

Regensburg, den 5. 5. 1993


(Dr. Günther Bernhardt)